

# DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

## ESTABILIDAD DEL mRNA DE *rbcL* EN EL CLOROPLASTO DE *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* : PAPEL DE LA REGIÓN 5'UTR

MARÍA LORETO SUAY LLOPIS

UNIVERSITAT DE VALENCIA  
Servei de Publicacions  
2008

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a Valencia el dia 28 de Setembre de 2007 davant un tribunal format per:

- D. Emilio Fernández Reyes
- D. José Antonio Darós Arnau
- D. Miguel Ángel Pérez Amador
- D. Alberto Quesada Molina
- D. Carlos García Ferris

Va ser dirigida per:

D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> Luisa Salvador Alcober

©Copyright: Servei de Publicacions  
María Loreto Suay Llopis

---

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-7001-8

Edita: Universitat de València  
Servei de Publicacions  
C/ Artes Gráficas, 13 bajo  
46010 València  
Spain  
Telèfon: 963864115

**Estabilidad del mRNA de *rbcL* en el  
cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii*:  
Papel de la región 5´UTR**

Memoria presentada por

**M<sup>a</sup> Loreto Suay Llopis**

Para optar al grado de Doctora en Biología

Directora:

**Dra. M<sup>a</sup> Luisa Salvador Alcober**

Dña. M<sup>a</sup> Luisa Salvador Alcober, Profesora Titular del Departament de Bioquímica y Biología Molecular de la Universitat de València

Certifica:

Que M<sup>a</sup> Loreto Suay Llopis, Licenciada en Ciencias Biológicas, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado "Estabilidad del mRNA de *rbcl* en el cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii*: Papel de la región 5'UTR", que presenta para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Para que así conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado a 9 de julio de 2007.

Firmado: M<sup>a</sup> Luisa Salvador Alcober

A mi madre, que es toda amor y dedicación.

A mi padre, mi propia estrellita, pequeñita pero firme.

A Benja.

En primer lugar, quisiera agradecer a Marisa el haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo, el haberme dado la opción y la facilidad para viajar y conocer lugares que nunca antes imaginé que podría ver y, sobretodo, agradecerle el esfuerzo y trabajo invertidos en esta tesis, especialmente, en los últimos meses. Del mismo modo, me gustaría también agradecer a Uwe su trabajo, sus ánimos y su amabilidad. Thanks a lot.

Gracias a todos los del laboratorio de plantas por estar ahí, haciendo que todo fuera más fácil y divertido y por ayudarme siempre que lo he necesitado: a Carlos; a Ana Cris; a Nuria; a Toni; a Ana; a Sonia; a Mayte; a Chimo; a Lola; a Sergi; a Alejandro. En especial a: a Caroline por su ayuda en el lab y por la ayuda que ella y su familia me brindaron en Oslo; a Pedro, por preocuparse por mi; a Julia por haberme desmontado y guardado Northernns, a M<sup>a</sup> Jesús, por su comprensión y por ser una compañera formidable de viajes y a ambas por el tiempo compartido en el barco y por las risas que nos echamos (it's not my problem!...); a Paco por muchísimas cosas... por resolverme dudas en la bancada y problemas en el ordenador, enseñarme los trucos de escribir una tesis, escucharme y aguantarme en becaris... Muchísimas gracias a Jorge por su ayuda en el lab y, sobre todo por hacer que los cafés tengan efecto relajante; a M<sup>a</sup> Ángeles por tomar el relevo de Jorge y escucharme; a Gema. A veces, ser fumador pasivo tiene su lado bueno. En general, gracias a toda la gente del departamento de Bioquímica que, de una forma u otra, han contribuido a este trabajo, simplemente estando ahí o ayudándome o contestando a mis preguntas (Aurora, Ana S., Ana P., Elena y Lorena (levaduras), Vicent, Lorena y Elena (chips), M<sup>a</sup> Àngels, Paco, J.R., Paqui, Emilia, Ramón...).

Durante estos 5 años este trabajo ha formado parte de mi vida. Creo que debo reconocer y agradecer el esfuerzo sincero que las personas más cercanas a mí han hecho durante todo este tiempo porque, de ese modo, también han contribuido a este trabajo. A mi madre, gracias por su apoyo incondicional, su fortaleza y su capacidad de sacrificio por nosotros. A mi padre, gracias por haber sido una guía y modelo de vida para mí. A mi Tete, a Alicia y a Jaume, gracias por cuidar de ellos mientras yo desconectaba de todo y gracias por quererme. A mis tíos y primos y al "grupo de mis padres", gracias porque sin vuestra ayuda y vuestro apoyo nada hubiera podido ser. Gracias a Manoli y Jose, a Silvia, a Sonia y Gabriel por preocuparos por mi y por los buenos

ratos que compartimos. Gracias a Raquel, Gema y David, Pili y Noe porque, a pesar de lo despegada que soy, sé que puedo contar con vosotros.

Y por último, gracias a Benja por haberme apoyado en los malos momentos y haber intentado hacerme sonreír, por estar a mi lado y ofrecerme siempre su compañía. Gracias por aguantar lo pesada que soy y por animarme cada día a intentarlo. A Marisa y Tinín, gracias por cuidar de nosotros y ayudarnos tanto.

Muchas gracias a todos.

<b>ÍNDICE</b>	
• Tabla de abreviaturas.	V
• Tabla de abreviaturas de genes.	VI
• Tabla de los nombres de las construcciones empleadas.	VII
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	
1. El cloroplasto y su origen endosimbiótico.	3
2. Procesos postranscripcionales en la regulación de la expresión génica en el cloroplasto.	5
2.1 Procesamiento de los mRNAs.	5
2.2 Traducción de los mRNAs.	7
2.3 Estabilidad de los mRNAs en el cloroplasto.	8
3. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> como organismo modelo para el estudio del cloroplasto.	11
3.1. Los genomas nuclear y mitocondrial de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .	12
3.2. El genoma del cloroplasto de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .	13
4. La enzima Rubisco.	15
<b>OBJETIVOS.</b>	17
<b>CAPÍTULO 1: Papel de las secuencias 5' UTR en la expresión génica de <i>rbcL</i> en el cloroplasto de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>.</b>	
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
1. Transcripción en el cloroplasto.	23
1.1 RNA polimerasas.	23
1.2 Terminación de la transcripción.	24
2. Elementos de secuencia implicados en la transcripción.	25
2.1 Promotores cloroplásticos.	25
2.2 Secuencias intensificadoras de la transcripción.	26
3. Regulación de la transcripción en el cloroplasto.	26
4. El promotor básico de <i>rbcL</i> en <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .	29
<b>RESULTADOS</b>	31
<b>DISCUSIÓN</b>	36
<b>CAPÍTULO 2: Determinantes estructurales de la estabilidad en la 5' UTR del mRNA de <i>rbcL</i> en el cloroplasto de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>.</b>	
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
1. Estabilidad de los mRNAs en la regulación de la expresión génica.	41
2. Determinantes de la estabilidad de los mRNAs de plantas.	42
2.1 Regulación de la estabilidad de los mRNAs.	45



3. Determinantes de los mRNAs procariotas:	46
4. Determinantes de los mRNAs del cloroplasto.	47
4.1 Regulación de la estabilidad de los mRNAs cloroplásticos.	51
5. Estabilidad del transcrito <i>rbcL</i> en <i>C. reinhardtii</i> . Elemento <i>cis</i> de estabilidad en la 5'UTR.	52
<b>RESULTADOS</b>	55
1. <b>Función de la primera estructura secundaria de la 5'UTR en la estabilidad de los transcritos.</b>	55
1.1 ¿Es la secuencia de la primera estructura secundaria esencial para la estabilidad de los transcritos de <i>rbcL</i> ?	55
1.2 ¿Se requiere la presencia de una estructura secundaria en el extremo 5' de un mRNA estable?	59
1.3 ¿Cambios en la forma o tamaño de la primera estructura secundaria de la 5'UTR afectan a la estabilidad de los mensajeros de <i>rbcL</i> ?	62
1.4 ¿Está relacionada la necesidad de la estructura en horquilla con el elemento de estabilidad descrito en la 5'UTR?	63
2. <b>Papel de la segunda estructura secundaria en la 5'UTR.</b>	66
<b>DISCUSIÓN</b>	
1. Abundancia de los transcritos de <i>rbcL</i> .	69
2. Papel de la conformación del elemento de estabilidad.	70
3. Importancia de la estabilidad en la regulación de la expresión génica en el cloroplasto.	72
<b>CAPITULO 3: Rastreo <i>in vivo</i> de factores <i>trans</i> con capacidad de unión a la 5'UTR de <i>rbcL</i> en <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>.</b>	
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
1. Dominios proteicos de interacción con el RNA.	77
2. Proteínas de unión al RNA.	80
2.1 RBPs que median la estabilidad de los transcritos.	81
2.2 RBPs que interaccionan con la 5'UTR de los transcritos.	82
2.3 RBPs que interaccionan con la 3'UTR de los transcritos.	87
3. Regulación de la interacción entre factores proteicos <i>trans</i> y los elementos <i>cis</i> de los transcritos.	88
<b>RESULTADOS</b>	
1. Unión <i>in vivo</i> de proteínas a la 5'UTR de <i>rbcL</i> .	92
2. Análisis de las proteínas de los aductos RNA GUS146-proteína mediante espectrometría de MS/MS.	95
3. Comprobación <i>in vitro</i> de la unión de las proteínas PDI y RB38 a la 5'UTR de <i>rbcL</i> .	99
<b>DISCUSIÓN</b>	
1. Estudios previos relacionados con los resultados obtenidos.	102

2.	Importancia de los resultados <i>in vivo</i> y problemas de la metodología de identificación empleada.	104
3.	Hipótesis del origen evolutivo del sistema de regulación de la estabilidad de <i>rbcL</i> en <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .	105
4.	Necesidad de estudios futuros.	107
<b>CAPITULO 4: Mecanismo de degradación de los RNAs.</b>		
<b>INTRODUCCIÓN</b>		
1.	Degradación de los mRNAs en eucariotas.	111
2.	Degradación de mRNAs en procariotas.	114
3.	Degradación de mRNAs en cloroplastos.	117
<b>RESULTADOS</b>		
1.	¿Afecta a la estabilidad de los transcritos en el cloroplasto la presencia de nucleótidos extra libres en el extremo 5'?	120
2.	Determinación del extremo 5' de los transcritos quiméricos.	120
<b>DISCUSIÓN</b>		
1.	El extremo 5' libre aumenta la inestabilidad de los transcritos cloroplásticos.	126
2.	Determinación del extremo 5' de los RNAs.	127
3.	Mecanismo de degradación de los transcritos cloroplásticos.	128
<b>CONCLUSIONES</b>		
<b>MATERIAL Y METODOS</b>		
1.	Medios de cultivo y cepas de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> utilizadas.	137
2.	Modificaciones de la 5'UTR del mRNA de <i>rbcL</i> de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .	137
2.1	Modificaciones en la primera estructura secundaria de la 5'UTR.	138
2.2	Modificaciones en la segunda estructura secundaria de la 5'UTR.	140
2.3	Determinación de las estructuras secundarias de la 5'UTR.	140
2.4	Clonación de las modificaciones de la 5'UTR en pBlueScript.	141
2.5	Clonación de las modificaciones en el vector de transformación cloroplástica.	141
2.6	Análisis de las clonaciones realizadas.	142
2.6.a.	Transformación de <i>Escherichia coli</i> .	142
2.6.b.	Extracción de DNA plasmídico.	143
3.	Transformación del cloroplasto de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> por biolística.	143
3.1	Preparación del mutante CC-373.	143
3.2	Preparación de los microproyectiles.	144
3.3	Biolística.	144
3.4	Selección de los transformantes fotosintéticos	144

4.	Análisis de transformantes fotosintéticos.	145
4.1	Extracción de DNA de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .	145
4.2	Extracción de RNA de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .	145
5.	Detección de ácidos nucleicos:	146
5.1	Sondas radiactivas de GUS y <i>atpB</i> .	146
5.2	Hibridación.	146
5.2.a.	Slot blot.	147
5.2.b.	Southern blot.	147
6.	Northern blot.	148
7.	Determinación de la velocidad de transcripción <i>in vivo</i> .	148
8.	Rastreo de factores <i>trans in vivo</i> con unión a la 5'UTR mediante retardo en gel y MS/MS.	150
8.1	Construcción del gen quimérico para el ensayo de retardo de movilidad electroforética.	150
8.2	Irradiación de las células con luz UV.	151
8.3	Lisis celular y obtención de aductos.	152
8.4	Análisis de los complejos RNA-proteínas.	153
8.4.a.	Electroforesis en condiciones desnaturalizantes.	153
8.4.b.	Northern blot.	153
8.4.c.	Sonda RNA146.	153
8.4.d.	Digestión con proteinasa K.	154
8.4.e.	Análisis de las proteínas por MS/MS.	155
9.	Comprobación <i>in vitro</i> de la unión de las proteínas RB38 y PDI a la 5'UTR de <i>rbcl</i> .	156
9.1	Expresión y purificación <i>in vitro</i> de RB38 y PDI.	156
9.2	Obtención de la 5'UTR de <i>rbcl</i> para el ensayo de interacción <i>in vitro</i> .	157
9.2.a.	Mutagénesis del promotor SP6 en un vector poliA, SP64.	158
9.2.b.	Modificación de la secuencia de policlonaje y clonación de la 5'UTR en un vector SP64polyA.	158
9.2.c.	Transcripción <i>in vitro</i> de la región 5'UTR de <i>rbcl</i> .	158
9.3	Ensayo de interacción <i>in vitro</i> .	158
10.	Análisis del extremo 5' del RNA por extensión del cebador.	159
10.1	Extensión del cebador con un oligonucleótido marcado con un fluoróforo.	159
10.2	Extensión del cebador marcado con $\gamma^{32}\text{P}$ en 5'.	159
10.2.a.	Marcaje del oligonucleótido en 5'.	159
10.2.b.	Retrotranscripción.	160
10.2.c.	Gel de secuenciación.	160
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	163

## Abreviaturas

<b>nt</b>	.....	nucleótidos
<b>Amp</b>	.....	ampicilina
<b>ARE</b>	.....	elemento de secuencia rico en AU
<b>cpDNA</b>	.....	DNA cloroplástico
<b>cpRNP</b>	.....	ribonucleoproteína del cloroplasto.
<b>DEPC</b>	.....	dietil pirocarbonato
<b>DMS</b>	.....	dimetil sulfato
<b>GUS</b>	.....	gen de la $\beta$ -glucuronidasa
<b>hnRBP</b>	.....	proteínas de unión a RNA nucleares heterogéneas
<b>HS</b>	.....	medio de cultivo rico en sales
<b>HSHA</b>	.....	medio de cultivo rico en sales y con acetato potásico
<b>IR</b>	.....	región invertida
<b>kb</b>	.....	kilobases
<b>LB</b>	.....	medio de crecimiento Luria-Bertani
<b>LBA</b>	.....	medio de crecimiento Luria-Bertani con ampicilina
<b>LDM</b>	.....	fracción membranosa cloroplástica de baja densidad
<b>mt DNA</b>	.....	DNA mitocondrial
<b>mt(+)/(-)</b>	.....	tipo sexual materno/paterno
<b>NEP</b>	.....	RNA polimerasa codificada nuclearmente
<b>PAGE</b>	.....	electroforesis en gel de poliacrilamida
<b>PAP</b>	.....	poliA polimerasa
<b>pb</b>	.....	par de bases
<b>PEP</b>	.....	RNA polimerasa codificada cloroplásticamente
<b>PNK</b>	.....	polinucleótido quinasa
<b>PNP</b>	.....	polinucleótido fosforilasa
<b>PPR</b>	.....	dominio proteico de pentatricopéptidos
<b>PS</b>	.....	fotosistema
<b>RBP</b>	.....	proteína de unión al RNA
<b>RE</b>	.....	retículo endoplasmático
<b>RNP</b>	.....	ribonucleoproteína
<b>RT</b>	.....	retrotranscripción
<b>Rubisco</b>	.....	ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa
<b>SAUR</b>	.....	elemento de respuesta a las auxinas
<b>SD</b>	.....	secuencia de Shine-Dalgarno
<b>SDR</b>	.....	corta repetición dispersa
<b>TPR</b>	.....	dominio proteico de tetratricopéptidos

Abreviatura del gen	Proteína codificada
<i>atpA</i>	..... Subunidad $\alpha$ de la ATP sintasa
<i>atpB</i>	..... Subunidad $\beta$ de la ATP sintasa
<i>Fed-1</i>	..... FERREDOXINA 1
<i>ndhB</i>	..... NADH deshidrogenasa
<i>petB</i>	..... Subunidad citocromo $b_6/f$
<i>petD</i>	..... Subunidad citocromo $b_6/f$
<i>psaA</i>	..... Subunidad A del PS I
<i>psaB</i>	..... Subunidad B del PS I
<i>psbA</i>	..... Subunidad D1 del PS II
<i>psbB</i>	..... Subunidad P5 del PS II
<i>psbC</i>	..... Subunidad P6 del PS II
<i>psbD</i>	..... Subunidad D2 del PS II
<i>psbH</i>	..... Subunidad del PS II
<i>psbL</i>	..... Subunidad del PS II
<i>psbT</i>	..... Subunidad del PS II
<i>PvPRP1</i>	..... Proteína rica en prolinas de la pared celular vegetal
<i>rbcL</i>	..... Subunidad grande de la Rubisco
<i>rbcS</i>	..... Subunidad pequeña de la Rubisco
<i>rpoA</i>	..... Subunidad $\alpha$ de la RNA polimerasa cloroplástica
<i>rpoB</i>	..... Subunidad $\beta$ de la RNA polimerasa cloroplástica
<i>rpoC1a y b</i>	..... Constituye parte de la subunidad $\beta'$ de PEP
<i>rpoC2</i>	..... Constituye parte de la subunidad $\beta'$ de PEP
<i>rpoD</i>	..... Subunidad $\sigma$ de la RNA polimerasa cloroplástica
<i>rps12</i>	..... Proteína de la subunidad ribosomal pequeña
<i>rps7</i>	..... Proteína de la subunidad ribosomal pequeña
<i>rm16</i>	..... RNA ribosómico 16S
<i>sig1→sig6</i>	..... Subunidades sigma de la RNA polimerasa cloroplástica
<i>tscA</i>	..... RNA implicado en el corte y unión en <i>trans</i> de los exones 1 y 2 de <i>psaA</i>
<i>tufA</i>	..... Factor de elongación EF-Tu
<i>uidA</i>	..... $\beta$ -glucuronidasa

Nombre	Descripción de la modificación realizada.
1	Cambios de secuencia desde +1→+9
2	Cambios de secuencia desde +10→+18
3	Cambios de secuencia desde +19→+27
4	Cambios de secuencia desde +28→+36
5	3 ribonucleótidos libres en el extremo 5´
6	5 ribonucleótidos libres en el extremo 5´
7	Cambios de secuencia sustituyendo de cada A→G, G→A, U→C y C→G desde las posiciones +6 →+36
8	Inversión de la secuencia silvestre +5→+37
9	Cambios de secuencia sustituyendo cada A→ G, G→A, U→C y C→G desde +6→+14 y +27→+36
10	Cambios de secuencia sustituyendo cada A→ G, G→A, U→C y C→G desde +6→+17 y +24→+36
11	Cambios de los nucleótidos +6, +9 y +10
12	Cambios de los nucleótidos +15, +16, +17, +19 y +20
13	Cambios de secuencia desde +10→+18 y desde +22→+30
14	Introducción de GCG en las posiciones +5, +6 y +7 y CGC en +35, +36 y +37
15	Eliminación de AAA en las posiciones +12, +13 y +14 y UUU en +28, +29 y +30
16	Cambio de secuencia en horquilla desde +5→+36 por una secuencia bacteriana de 14 ribonucleótidos
17	Intercambiar la secuencia +1→+4 por sus complementarios +41→+38
18	Deleción de los ribonucleótidos +1 y +2
19	Extensión de 5 ribonucleótidos (UCCGG) en el extremo, capaces de aparear con las posiciones +42→+46
20	Extensión de 6 ribonucleótidos (AAGAAC) formando un extremo 5´ libre
21	Cambios de secuencia que destruyen la segunda horquilla, +48→+63
22	Cambios de secuencia que mantienen la segunda horquilla, +48→+63
23	Extensión de 1 ribonucleótido (C) formando un extremo 5´ libre
24	Extensión de 4 ribonucleótidos (AGCC) formando un extremo 5´ libre
25	Extensión de 8 ribonucleótidos (AGAAGAAC) formando un extremo 5´ libre

## INTRODUCCIÓN GENERAL

### 1. El cloroplasto y su origen endosimbiótico.

El cloroplasto es el orgánulo que transforma la energía de la luz en energía metabólicamente útil para la biosíntesis de las moléculas orgánicas que nutrirán al conjunto de la célula fotosintética. Por su importancia funcional en el metabolismo de las plantas se ha estudiado extensamente a nivel fisiológico y bioquímico en las últimas décadas. Debido a su origen endosimbiótico contiene su propio material genético de origen bacteriano. En la actualidad, se ha progresado notablemente en el conocimiento de su biología molecular, principalmente debido al desarrollo de procedimientos eficientes para su transformación genética. La posibilidad de manipular la información genética del cloroplasto ha despertado grandes expectativas con fines biotecnológicos.

El cloroplasto, como la mitocondria, desciende de organismos procariotas de vida libre que entraron en una célula hospedadora como endosimbiontes y, gradualmente, se transformaron en estos orgánulos. El grupo filogenéticamente más cercano a los cloroplastos es el de las cianobacterias (Bhattacharya y Medlin, 1998). Durante su evolución, la mayoría de los genes del endosimbionte fueron eliminados o desplazados al núcleo. Debido a este origen endosimbiótico las características de su genoma y de su expresión génica son procariotas. Sin embargo, en las células eucariotas, como consecuencia de la presencia de estos orgánulos semiautónomos, es necesario que exista una coordinación de los distintos sistemas genéticos que garantice el correcto funcionamiento de la célula (Nickelsen y Kuck, 2000). El genoma nuclear debe controlar la biogénesis, el tamaño y número de cloroplastos en la célula. La expresión de complejos proteicos cloroplásticos con componentes codificados por los dos genomas requiere una especial coordinación entre ambos, al tener que contemplar además el diferente número de copias de cada gen según pertenezca al genoma nuclear o al cloroplástico. El control que el núcleo ejerce sobre el cloroplasto está mediado principalmente por proteínas codificadas nuclearmente que han de ser importadas al cloroplasto, donde actuarán interaccionando con proteínas o RNAs codificadas en el orgánulo (Rochaix, 1996).



El mantenimiento de parte del genoma endosimbiótico en el propio orgánulo supone un alto coste energético para la célula. La mayoría de las proteínas cuya codificación se ha mantenido en el genoma organular participan en el proceso de la fotosíntesis o son proteínas de la maquinaria de expresión génica cloroplástica. Una posible explicación del mantenimiento de esta información genética en el propio orgánulo podría ser que estas proteínas de membrana son particularmente difíciles de importar y ser ensambladas correctamente, debido a su alta hidrofobicidad. Esta explicación es consistente con el patrón de proteínas codificadas en el genoma mitocondrial (Dyall *et al.*, 2004). También se ha propuesto que este mantenimiento ofrece la ventaja evolutiva de garantizar una respuesta rápida frente al estrés oxidativo. Por ejemplo, cambios en el potencial redox pueden controlar rápidamente los efectos adversos de una cadena de transporte fotosintético alterada si sus componentes proteicos se encuentran codificados en el propio orgánulo. Esta hipótesis sería válida tanto para el genoma mitocondrial como para el cloroplástico (Raven y Allen, 2003).

En las células eucariotas fotosintéticas la expresión de los genes nucleares que codifican proteínas cloroplásticas está controlada principalmente a nivel transcripcional. En cambio, se ha demostrado que dentro del cloroplasto la regulación de la expresión génica es dependiente de procesos postranscripcionales como la estabilización de los mRNAs, la traducción o incluso de modificaciones postraduccionales (Nickelsen, 1998). Controlar los mecanismos postranscripcionales ofrece la ventaja de poder responder con mayor celeridad ante cambios ambientales o del desarrollo. Una respuesta rápida resulta esencial en un orgánulo en el que, por ejemplo, cambios de intensidad luminosa pueden tener efectos fatales para la célula debido al estrés oxidativo.

Los factores nucleares implicados en la expresión génica del cloroplasto participan en todos los pasos de la expresión génica organular. Algunos modulan la expresión en respuesta al desarrollo y a factores ambientales. La mayoría de los que se han identificado mediante aproximaciones bioquímicas pertenecen a la maquinaria básica de expresión génica, mientras que aquellos identificados por aproximaciones genéticas, en general, participan en procesos

postranscripcionales de un gen específico o de grupos de genes cloroplásticos implicados en la misma función (Barkan y Goldschmidt-Clermont, 2000).

### 2. Procesos postranscripcionales en la regulación de la expresión génica en el cloroplasto.

En plantas superiores se han descrito mutantes nucleares con defectos en la expresión génica del cloroplasto y todos ellos comparten el hecho de que exhiben alteraciones globales, que afectan a todos o a conjuntos de genes del orgánulo (Nickelsen, 1998). Sin embargo, en *Chlamydomonas reinhardtii* todas las mutaciones nucleares que se han estudiado hasta la fecha y que tienen algún efecto en la expresión génica del cloroplasto presentan dos características comunes: que afectan a la expresión individual de genes cloroplásticos y, en la mayoría o todos los casos, que afectan a estadios postranscripcionales de la expresión génica. De hecho, en esta alga se han descrito mutantes fotosintéticos con defectos en cada uno de los distintos procesos postranscripcionales. Es posible que las mutaciones pleiotrópicas afecten de manera letal a las células de *C. reinhardtii* y esa sea la razón por la cual sólo se encuentren mutantes que presenten alterada la abundancia de un transcrito en concreto (Goldschmidt-Clermont, 1998).

Los mRNAs cloroplásticos, como ocurre en procariotas, no contienen estructura de cabecera en 5' ni cola poliA en el extremo 3' que protejan sus extremos y contienen repeticiones invertidas en la región 3'. Son transcritos como precursores de RNA que deben sufrir una variedad de procesos postranscripcionales que conducen a su maduración y traducción. El procesamiento de la molécula de RNA y su traducción son los procesos postranscripcionales que más se han relacionado con la estabilidad de los transcritos.

#### 2.1. Procesamiento de los mRNAs.

En plantas superiores se pueden detectar los transcritos primarios policistrónicos de los mRNAs cloroplásticos y distintas formas intermedias de su maduración. En cambio, en *C. reinhardtii* los mRNAs primarios son monocistrónicos, aunque se han descrito también genes cotranscritos, como *psbD-psaA*, *petB-petD* y *psbB/psbI/psbH* (Johnson y Schmidt, 1993; Sakamoto *et al.*, 1994). Estos transcritos policistrónicos se acumulan a bajas concentraciones

o, simplemente, no pueden ser detectados. Probablemente esto se deba a que sufren un rápido procesamiento o a que su precursor presenta una menor estabilidad (Buschlen *et al.*, 1991; Choquet *et al.*, 1988).

Los extremos 5' y 3' de los mensajeros cloroplásticos maduros, generalmente, son el resultado del procesamiento de los transcritos primarios (Stern y Grisse, 1987; Stern *et al.*, 1991). La mayoría de los mRNAs cloroplásticos presentan en la 3'UTR repeticiones invertidas ricas en AU que normalmente forman estructuras secundarias (Monde *et al.*, 2000; Rott *et al.*, 1998). Éstas han demostrado ser esenciales para la formación del extremo 3' y para la estabilidad de los mensajeros, aunque no contienen elementos de secuencia que gobiernen su estabilidad (Stern *et al.*, 1991; Barnes *et al.*, 2005). Su ausencia hace que los transcritos sean más inestables y heterogéneos en longitud, aunque pueden ser traducidos (Rochaix, 1996). Cada transcrito cloroplástico presenta un extremo 3' específico y parece que existe más de un mecanismo que puede actuar para formar el extremo 3' y así estabilizar los transcritos finales (Stern y Grisse, 1987). Las proteínas que en plantas superiores se han encontrado unidas específicamente a la 3'UTR de los mensajeros presentan funciones relacionadas con el procesamiento del transcrito y no con su estabilidad (Jenkins *et al.*, 1997). En *C. reinhardtii* apenas hay información descrita acerca de proteínas relacionadas con el procesamiento del extremo 3' de los transcritos cloroplásticos.

Otro evento que forma parte del procesamiento de mensajeros cloroplásticos es la eliminación de intrones. En el cloroplasto de plantas superiores y de algas aparecen genes con intrones autocatalíticos *in vitro* de los grupos I y II. En *C. reinhardtii*, dos genes, 23S rRNA y *psbA*, contienen intrones pertenecientes al grupo I. Sólo el mRNA de *psaA* contiene dos intrones pertenecientes al grupo II y presenta la particularidad de estar codificado en tres precursores de RNA distintos, por lo que su maduración implica dos pasos de corte y unión en *trans*. Se han identificado mediante aproximaciones genéticas hasta 14 loci nucleares y 1 locus cloroplástico (*tscA*) implicados en la maduración de este mRNA (Barkan y Goldschmidt-Clermont, 2000). La imposibilidad de eliminar los intrones de los mensajeros afecta a la vida media de los transcritos no maduros (Monde *et al.*, 2000).

## 2.2. Traducción de los mRNAs.

La traducción supone una etapa clave en la expresión génica del cloroplasto ya que es el último punto de control que asegura la acumulación estequiométrica de proteínas derivadas de dos compartimentos físicamente separados (Wostrikoff *et al.*, 2004). En el cloroplasto el hecho de que la transcripción, la maduración de los transcritos y la traducción ocurran en el mismo compartimento requiere la consideración de cómo estos procesos pueden estar acoplados e interrelacionados.

La maquinaria de traducción cloroplástica se asemeja a la de procariotas aunque presenta algunas características diferenciales. Por ejemplo, los ribosomas cloroplásticos son similares a los bacterianos en tamaño y sensibilidad a los antibióticos, además de presentar homología de secuencia de la mayoría de los componentes ribosómicos con sus parientes filogenéticos más cercanos. A pesar de estas similitudes los mecanismos de traducción en el cloroplasto difieren en algunos aspectos. Por ejemplo, en los cloroplastos, lo mismo que en cianobacterias, la secuencia Shine-Dalgarno no participa de manera fundamental en la traducción y, si existe, presenta localizaciones, tamaños y composición de secuencias hipervariables, comparadas con las de *Escherichia coli* (Fargo *et al.*, 1998). Los codones de inicio preferenciales en el cloroplasto son AUG y UAA y en *C. reinhardtii* la mayoría de los genes presentan AUG como codón de inicio aunque, por ejemplo, se emplea GUG en *psbC* (Bonham-Smith y Bourque, 1989; Hauser *et al.*, 1998).

Se piensa que los factores codificados nuclearmente implicados en la traducción interaccionan con la región 5'UTR de los mensajeros cloroplásticos (Mayfield *et al.*, 1994; Zerges *et al.*, 1997). La región 3'UTR no afecta a la acumulación de proteína pero su presencia es esencial para la traducción. Interacciones entre la región 5'UTR y la región codificante influyen positivamente en la eficiencia de la traducción (Eibl *et al.*, 1999).

En *C. reinhardtii*, mediante construcciones de genes quiméricos, se ha descrito que existe una relación directa entre la cantidad de un mensajero específico y el de su correspondiente proteína (Barnes *et al.*, 2005). Sin embargo, estudios anteriores indican que esta correlación es mínima en la acumulación de proteínas endógenas y que es la traducción el factor limitante para la producción de proteínas (Eberhard *et al.*, 2002; Choquet y Wollman, 2002). Esta

diferencia de resultados podría deberse al efecto de la propia región codificante y a sus interacciones con la 5'UTR, sólo presentes en los mRNAs endógenos (Barnes *et al.*, 2005). Se han descrito elementos de secuencia implicados en la traducción localizados en la región 5'UTR de los mensajeros. Por ejemplo, en el mensajero cloroplástico de *psbA* se ha descrito una caja AU (AUUAAAUAAA) esencial para la traducción de este mensajero (Hirose y Sugiura, 1996).

La luz es la principal señal externa que influye, a nivel molecular, en los distintos aspectos de la expresión génica del cloroplasto, entre ellos la traducción. El efecto de la luz está mediado por la cadena de transporte fotoelectrónico. De manera generalizada, la traducción de la mayoría de los mensajeros en cloroplastos maduros se correlaciona positivamente con la intensidad lumínica.

### **2.3. Estabilidad de los mRNAs en el cloroplasto.**

La abundancia de mRNA de un gen en particular viene determinada por su tasa de síntesis y por su tasa de degradación y el mantenimiento de las cantidades de mensajeros específicos es un paso fundamental en la regulación de la expresión génica de la célula (Barnes *et al.*, 2004).

Los mensajeros cloroplásticos y de bacterias son similares en cuanto a que no están protegidos por sus extremos, como lo están los mensajeros del citoplasma de eucariotas. Sin embargo, se diferencian entre sí porque los mRNAs del cloroplasto presentan vidas medias más largas y sus tasas de degradación pueden variar ampliamente entre distintos mRNAs (desde 20 minutos hasta 20 horas) (Herrin y Nickelsen, 2004). La gran plasticidad para modificar la vida media de sus mensajeros permite a la célula adaptar sus patrones de síntesis proteica, lo que resulta esencial para responder de forma rápida a estímulos externos e internos.

Se ha descrito que en los cloroplastos la tasa de transcripción modula la abundancia global de los transcritos más que la abundancia de transcritos individuales (Hambræus *et al.*, 2003; Herrin y Nickelsen, 2004). En el cloroplasto de *C. reinhardtii* la medida de la velocidad de transcripción *in vivo* para distintos genes es máxima al principio de la fase luminosa (20 minutos) con un descenso significativo a las 7 horas del período luminoso y una recuperación de la misma

hacia el final del período de oscuridad, para alcanzar el máximo de transcripción en el siguiente fotoperíodo (Salvador *et al.*, 1993b). En algunos genes del cloroplasto de *C. reinhardtii* se ha observado que existe un control de la abundancia de mensajeros mediado por la luz (p.e. en *psaB*, *psbA* y *rbcl*) y en otros genes este control parece responder a ritmos endógenos (p.e. en *atpA*, *atpB* y *tufA*) en un régimen de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. No obstante, la abundancia específica de cada transcrito no fluctúa mucho a lo largo del fotoperíodo, sugiriendo que tienen lugar procesos adicionales de estabilización de los mRNAs que se imponen a este control general de la transcripción.

Existe una regulación de la estabilidad por cambios de luz/oscuridad que afecta de manera general a todos los RNAs endógenos analizados en el cloroplasto de *C. reinhardtii*. En todos los RNAs endógenos cloroplásticos analizados decae su estabilidad en la luz y aumenta en oscuridad, aunque unos son mucho más estables (rRNA, *rbcl*) que otros (*tufA*) (Salvador *et al.*, 1993b).

Por otro lado, el análisis de mutantes nucleares y del cloroplasto ha revelado que la degradación de los RNAs no es un proceso al azar ni un proceso generalizado sino que parece existir una regulación de la degradación específica de cada mensajero. Se ha descrito un elevado número de loci nucleares implicados en la expresión génica del cloroplasto y mutantes nucleares en los que se ve afectada la estabilidad de transcritos específicos dentro del cloroplasto (Eibl *et al.*, 1999; Staub y Maliga, 1995). Así pues, todo parece indicar que la expresión diferencial de los genes cloroplásticos depende básicamente de mecanismos que operan sobre la estabilidad de los transcritos a nivel específico (Nickelsen y Kuck, 2000). El control de la estabilidad en el orgánulo le permite asegurar la acumulación estequiométrica de proteínas cloroplásticas, lo que garantiza el mantenimiento de la eficiencia fotosintética (Rochaix, 1996).

Aunque no se conocen con detalle los mecanismos moleculares responsables del control de la vida media de los mRNAs en el cloroplasto, estos mecanismos parecen tener en común la interacción específica entre proteínas reguladoras y secuencias *cis* o elementos estructurales presentes en la molécula de RNA cloroplástico. Estos elementos *cis* se localizan principalmente en las regiones 5'UTR y 3'UTR de los transcritos y, en ocasiones, en la región codificante,

tanto en algas (Nickelsen, 1998) como en plantas superiores (Hua *et al.*, 2001). En el cloroplasto, como en bacterias, se ha descrito que la región 5'UTR está implicada en la regulación de la estabilidad (Hua *et al.*, 2001; Salvador *et al.*, 2004) y la traducción de los mensajeros (Nickelsen, 1999; Eibl *et al.*, 1999).

En el cloroplasto no existe una separación espacial entre los distintos procesos que afectan a los mensajeros y, como la estabilidad y la traducción dependen de la región 5', en muchos casos resulta difícil diferenciar entre elementos implicados en la estabilidad, la traducción o ambas. Por ejemplo, se han descrito elementos de secuencia en *C. reinhardtii* en la región 5'UTR de *petD* implicados en ambos procesos (Higgs *et al.*, 1999). En cambio, existen casos en los que se ha podido determinar la implicación de un elemento *cis* únicamente en la traducción (Hirose y Sugiura, 1996) o en la estabilidad (Anthonisen *et al.*, 2001) de un mensajero concreto. La unión de los ribosomas a la región 5'UTR de los mensajeros determinará la eficiencia de su traducción y, debido a la conexión entre estabilidad y traducción, distintos trabajos se han centrado en el estudio del efecto, en términos de estabilidad, de la unión de los ribosomas a los mensajeros. Estos estudios indican que este efecto no siempre es el mismo y es dependiente de la especie de la que se trate y del mensajero en concreto. En *E. coli* la unión del ribosoma a la región 5'UTR es un determinante esencial para la longevidad de los transcritos (Arnold *et al.*, 1998). En cloroplastos de plantas superiores existen evidencias de que la asociación de los mensajeros a los ribosomas afecta al decaimiento de los transcritos, aunque la relación no afecta siempre del mismo modo. Por ejemplo, en hojas en desarrollo de espinaca los mensajeros de *rbcl* y *psbA* son menos estables si están unidos a los polisomas, probablemente por nucleasas específicas asociadas a los polisomas (Klaff y Gruissem, 1991; Rochaix, 1992). En cambio, en maíz y en *C. reinhardtii*, ocurre lo contrario ya que se han descrito mutantes nucleares que presentan cantidades reducidas de los transcritos de *rbcl* y *psbA* por una menor asociación de los mRNAs a los ribosomas (Barkan, 1993; Bruick y Mayfield, 1998; Yohn *et al.*, 1996).

### 3. *Chlamydomonas reinhardtii* como organismo modelo para el estudio del cloroplasto.

Las algas del género *Chlamydomonas* están clasificadas taxonómicamente dentro del orden de algas verdes Chlorophyceae, las cuales se ha supuesto que representan el ancestro de las plantas superiores. *C. reinhardtii* se ha denominado la levadura verde para enfatizar todas las ventajas técnicas de su uso como organismo modelo (Ferris y Goodenough, 1994).

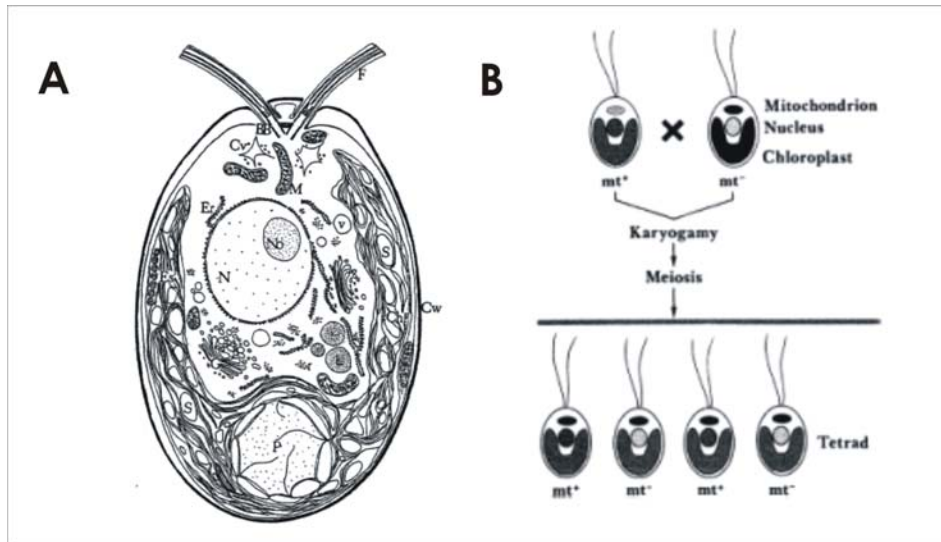
Estas algas verdes pueden encontrarse en agua salada, dulce, en el suelo e incluso en la nieve. Se han descrito más de 500 especies de *Chlamydomonas* aunque científicamente sólo se trabaja con unas cuantas especies, siendo *C. reinhardtii* la más empleada en el laboratorio.

*C. reinhardtii* es un organismo eucariota fácilmente cultivable cuyas células crecen rápidamente presentando un ciclo biológico haplo-diploide. Las células vegetativas son haploides y en ellas se puede inducir la formación controlada de meiosporas mediante privación de nitrógeno en el medio de cultivo. Los gametos, morfológicamente similares, sólo se diferencian en el locus genético mt (mt+ y mt-) que determina el tipo sexual (Nickelsen y Kuck, 2000). Cuando las condiciones nutricionales mejoran el cigoto diploide resultante produce 4 células haploides lo que permite el análisis genético y el seguimiento de mutaciones heredables.

*C. reinhardtii* es una célula con estructura polar y forma elipsoide, de  $\approx 10 \mu\text{m}$  de longitud y  $3 \mu\text{m}$  de ancho, con dos flagelos anteriores, algunas mitocondrias y un único cloroplasto basal que ocupa casi el 40% del volumen celular y que rodea al núcleo. En condiciones de oscuridad y heterotrofia es capaz de ensamblar correctamente sus complejos fotosintéticos y crecer empleando acetato como fuente alternativa de carbono, el cual es asimilado por la ruta del glioxilato (Harris, 2001). Puede crearse fotoautotrófica, mixotrófica o heterotróficamente, lo que ha permitido el estudio de numerosos mutantes fotosintéticos. Por todo ello habitualmente se ha empleado *C. reinhardtii* como organismo modelo para el estudio de la fotosíntesis (Nickelsen y Kuck, 2000). Las actuales herramientas moleculares aplicadas a este organismo junto con las técnicas de análisis genético y la existencia de muchísimos mutantes fotosintéticos han hecho de esta alga un poderoso modelo de estudio para el estudio de la regulación de la expresión génica en el cloroplasto.



Tradicionalmente se ha empleado para el estudio de la estructura y ensamblaje del flagelo, gametogénesis, fototaxis y respuesta fisiológica a la luz y a los nutrientes (Harris, 2001). En la actualidad se están llevando a cabo estudios con este organismos que permitan solucionar problemas de biología aplicada como la producción de H<sub>2</sub> como energía alternativa limpia o la biorremediación en el caso de contaminaciones por metales pesados (Shrager *et al.*, 2003).



**Figura 1.1. *Chlamydomonas reinhardtii*.** A) Estructura celular de *Chlamydomonas* en interfase. Longitud de la célula 10 µm; BB, cuerpo basal; Chl, cloroplasto; Cv, vacuola contráctil; Cw, pared celular; ER, retículo endoplasmático; Es, mancha ocular; F, flagelo; G, aparato de Golgi; L, cuerpo lipídico; Mi, mitocondria; N, núcleo; No, nucleolo; P, pirenoide; r, ribosomas; S, grano de almidón; V, vacuola. De Harris, 2001. B) Análisis genético en *C. reinhardtii*. Mientras las mutaciones nucleares son heredadas de un modo mendeliano, las mutaciones en el genoma cloroplástico y mitocondrial se heredan por vía uniparental. De Nickelsen y Kuck, 2000.

### 3.1 Los genomas nuclear y mitocondrial de *Chlamydomonas reinhardtii*.

Las células de los miembros del reino Plantae contienen tres compartimentos celulares con información genética propia: el núcleo, el cloroplasto y la mitocondria. En *C. reinhardtii* los tres genomas pueden ser manipulados genéticamente.

El genoma nuclear contiene 100 Mpb distribuidos en 17 grupos génicos de ligamiento y en la actualidad se encuentra secuenciado completamente,

aunque no está completamente anotado (Shrager *et al.*, 2003). En la división meiótica de la célula los distintos genes nucleares se heredan mendelianamente. Este genoma es inusualmente rico en contenido de G+C (65%). La transformación del núcleo se lleva a cabo introduciendo el DNA foráneo mediante la agitación de bolas de vidrio con células carentes de pared celular o mediante electroporación (Randolph-Anderson *et al.*, 1993). En cualquier caso, la recombinación homóloga en el DNA nuclear ocurre a muy baja frecuencia y la inserción del DNA foráneo tiene lugar al azar mediante recombinación heteróloga.

El genoma mitocondrial, presente en múltiples copias, se caracteriza por ser un genoma de DNA lineal pequeño (5.8 kpb) con regiones invertidas en los extremos implicadas en la estabilización de los mismos. Todos los gametos, tanto los mt(+) como los mt(-), heredan el DNA mitocondrial de la cepa mt(-). Es característico el reducido contenido génico en comparación con otros genomas mitocondriales de otras algas verdes y plantas superiores. Recientemente la transformación del DNA mitocondrial en esta alga ha sido mejorada mediante biolística logrando una alta eficiencia de transformación. De este modo se consigue disponer de un sistema modelo alternativo a *Saccharomyces cerevisiae* para el estudio y la manipulación del genoma mitocondrial (Remacle *et al.*, 2006).

### 3.2 El genoma del cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii*.

El genoma cloroplástico de *C. reinhardtii* presenta muchas características en común con el genoma cloroplástico de plantas superiores. Los genes cloroplásticos están altamente conservados entre los distintos genomas secuenciados hasta el momento. El cloroplasto es un orgánulo poliploide que presenta aproximadamente 80 copias de su genoma. Se hereda monoparentalmente de la cepa mt(+) y tras la formación del cigoto el genoma cloroplástico de la cepa mt(-) es degradado por la acción de nucleasas (Nickelsen y Kuck, 2000). Es un DNA circular de aproximadamente 196 kpb que codifica 99 genes de la maquinaria fotosintética (fotosistemas I y II, citocromo *b<sub>6</sub>/f*, ATP sintasa, y *rbcl*) y de la maquinaria de expresión génica del orgánulo (5 subunidades de la RNA polimerasa, 5 rRNAs, 17 proteínas ribosomales, 30 tRNAs y factores de la traducción y transcripción) (Shrager *et al.*, 2003). La mayoría de

los genomas cloroplásticos presentan dos copias de dos grandes regiones invertidas (IR) que pueden variar de 5 kb a 76 kb en longitud, resultado de una duplicación de los genes rRNA y otros genes (Rochaix y Malnoe, 1978). En *C. reinhardtii* estas regiones están separadas entre sí por dos regiones únicas de prácticamente el mismo tamaño (80.873 y 78.100 pb). La organización génica dentro de las regiones invertidas es típica de plantas superiores, excepto porque el rRNA 23S está dividido por un intrón (Erickson *et al.*, 1984) y *psbA* por cuatro intrones (Palmer, 1985). En plantas superiores existen, entre distintos taxones, importantes variaciones del tamaño del genoma cloroplástico, debidas al tamaño de las regiones invertidas, sin afectar a la complejidad genómica. En cambio, las variaciones existentes dentro del género *Chlamydomonas* están atribuidas a múltiples eventos de deleciones e inserciones fuera de estas regiones (Sakamoto *et al.*, 1994).

Mientras que la mayoría de los genes cloroplásticos en plantas superiores están organizados en operones, en el cloroplasto de *C. reinhardtii* los genes no presentan principalmente esta estructura, aunque también los hay así organizados, como los genes de las proteínas ribosomales (Stern y Drager, 1998).

El genoma cloroplástico de *C. reinhardtii* contiene dos copias de un elemento móvil de DNA de 2.4 kb denominado Wendy (Wendy I y II). Estas dos copias de Wendy han divergido por acumulación de mutaciones puntuales y por pequeñas deleciones e inserciones. Estos dos elementos de *C. reinhardtii* interrumpen el orden relativo de genes dentro de dos clusters génicos que son contiguos en *C. moewusii*, sugiriendo que este elemento transponible invadió *C. reinhardtii* tras la separación de estos dos linajes (Fan *et al.*, 1995).

En la actualidad este genoma se encuentra completamente secuenciado lo que ha permitido conocer y corroborar mucha de la información genética obtenida previamente mediante análisis más clásicos (Shrager *et al.*, 2003). El genoma del cloroplasto de *C. reinhardtii* tiene características particulares con respecto a los genomas cloroplásticos de plantas superiores. Presenta una gran cantidad de cortas repeticiones dispersas (SDRs) entre las regiones codificantes, una atípica división del gen *rpoC1*, contiene un gen (*tscA*) implicado en la eliminación de intrones en *trans* de *psbA*, presenta dos grandes ORFs de función desconocida pero esenciales para el organismo y se caracteriza por la ausencia de genes *ndh* (Shrager *et al.*, 2003; Maul *et al.*, 2002).

La comprensión del funcionamiento de la expresión génica en el cloroplasto requiere la inserción y expresión de DNA foráneo en este genoma. La transformación del cloroplasto se lleva a cabo mediante un sistema de biolística que se desarrolló al final de la década de los 80 y que permitió la primera transformación estable de un DNA cloroplástico (Boynton *et al.*, 1988). Este orgánulo presenta una alta tasa de recombinación homóloga lo que permite la inserción direccional del DNA foráneo con una alta eficiencia de transformación este genoma. La transformación genética del cloroplasto ha despertado un gran interés dentro de la biotecnología agrícola en los últimos años debido a características intrínsecas de este compartimento celular que le proporcionan ventajas en comparación con la transformación nuclear de plantas. Por ejemplo, son ventajas a nivel biotecnológico la inserción direccional del DNA foráneo (ya que permite el control de la expresión génica del DNA insertado), el procesamiento de mRNAs policistrónicos (muchas cualidades de interés agronómico son multigénicas y el sistema de organización en operones facilitaría la expresión fenotípica de caracteres multigénicos) y la herencia uniparental de este orgánulo (evitará la transferencia vertical de los transgenes a poblaciones naturales, ya que la herencia del cloroplasto es materna y los granos de polen no contienen cloroplastos). La explotación de los cloroplastos como dianas para objetivos biotecnológicos pasa por la profundización en el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en el control de la expresión génica en el orgánulo. En *C. reinhardtii* se han llevado a cabo numerosos estudios con genes quiméricos, resaltando el enorme potencial de este organismo como biofactoría para la expresión de proteínas heterólogas de interés biotecnológico (Franklin y Mayfield, 2004; Tregoning *et al.*, 2004).

#### 4. La enzima Rubisco.

La ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco, E.C. 4.1.1.39) es una enzima bifuncional, cuya actividad carboxilasa es responsable de la mayor parte de la conversión de CO<sub>2</sub> inorgánico en carbono orgánico en todos los organismos fotosintéticos eucarióticos y la mayor parte de los procarióticos. Es, probablemente, la enzima más abundante de la tierra y prácticamente todo el carbono orgánico ha pasado alguna vez por el centro activo de la enzima. En eucariotas fotosintéticos, la Rubisco se localiza en el cloroplasto y es una enzima

compuesta por 8 subunidades grandes (50 kDa) y 8 pequeñas (15 kDa). Las subunidades grandes conforman el centro catalítico y se hallan codificadas por un único gen (*rbcl*) en el genoma cloroplástico, mientras que las subunidades pequeñas son codificadas por una familia génica (*rbcS*) localizada en el genoma nuclear por lo que deben ser importadas al cloroplasto para ensamblar el holoenzima funcional.

La regulación de la síntesis de la enzima funcional Rubisco requiere la coordinación de la expresión de los genomas cloroplástico y nuclear y se halla, por consiguiente, bajo el control de varios mecanismos de regulación. Aparentemente, la cantidad de holoenzima funcional sintetizado depende fundamentalmente de la expresión del gen cloroplástico *rbcl*, ya que la subunidad pequeña de la Rubisco se sintetiza en exceso y es degradada en el cloroplasto cuando su ensamblaje en la holoenzima se ve limitado por falta de subunidad grande (Manen *et al.*, 1994). Un estudio reciente, en tabaco, confirma que la síntesis de la subunidad grande no está regulada por la disponibilidad de subunidad pequeña. Cuando la subunidad grande se acumula expone un dominio que actúa como represor de su propia síntesis, autorregulando así su traducción (Wostrikoff y Stern, 2007). La traducción de ambas subunidades de la Rubisco está regulada por la luz.

En dicotiledóneas el gen *rbcl* se transcribe desde un promotor localizado a 156-185 nucleótidos del inicio de la traducción. Este transcrito primario es procesado en la región 5'UTR entre los nucleótidos -59 y -69, desde el inicio de la traducción, según especies. Tanto la forma procesada como la no procesada del transcrito de *rbcl* se han encontrado asociadas a los polisomas y este procesamiento juega un papel esencial en la regulación de la traducción en condiciones lumínicas (McCormac *et al.*, 2001). En *C. reinhardtii* el mensajero de *rbcl* se transcribe desde una caja TATA extendida en la posición -10 (Klein *et al.*, 1992) y presenta una región 5'UTR de 92 nucleótidos que no requiere procesamiento.

En plantas C4 (*Amaranthus hypochondriacus*), tanto en las células de la vaina del haz como en las del mesófilo se transcribe el mRNA de *rbcl* pero sólo se traduce en este primer tipo celular. Esta regulación diferencial de la expresión de Rubisco se debe a variaciones de la estabilidad o al procesamiento diferencial del transcrito en cada tipo celular (Boinski *et al.*, 1993).

## OBJETIVOS

Este trabajo se enmarca dentro del objetivo general del estudio de los mecanismos que controlan la degradación de los mRNAs en el cloroplasto, y más concretamente, se centra en el estudio de la estabilidad del transcrito del gen *rbcL*, que codifica la subunidad grande de la ribulosa 1,5 bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco). En el estudio de los factores implicados en la regulación de la degradación de los mRNAs se pueden considerar dos niveles: los elementos de la molécula de RNA que dictan la estabilidad y regulación de los distintos transcritos (**elementos *cis***) y los componentes de la maquinaria proteica (**elementos *trans***), los enzimas y cofactores, responsables de la degradación o del mantenimiento de la estabilidad.

Estudios previos revelan la posible existencia de un elemento del promotor localizado dentro los primeros 36 nucleótidos de la región 5'UTR. La presencia de este elemento después del inicio de la transcripción de un mRNA representaría un nuevo tipo de promotor no descrito hasta el momento en *C. reinhardtii*. En esta región no traducible se ha localizado una secuencia de 10 nucleótidos necesaria para la estabilización del RNA. Este elemento forma parte, parcialmente, de una estructura secundaria y frecuentemente éstas se han relacionado con la estabilidad.

La hipótesis de trabajo es que la estabilidad del mensajero de *rbcL* está controlada por la unión de algún o algunos factores proteicos, de codificación nuclear, que deben de reconocer esta secuencia o elemento estructural en la región 5'UTR de forma, aparentemente, específica. Entre estas proteínas se encuentran los factores reguladores que protegerían el RNA y aquellos que estimularían su degradación.

Los **objetivos** concretos de este trabajo son:

### **1. Determinación del papel de la 5'UTR en la expresión génica de *rbcl*.**

#### **1.1 Delimitar la existencia de elementos del promotor en la región 5'UTR de *rbcl*.**

Empleando mutaciones dirigidas, se pretende acotar un posible elemento del promotor dentro de la región 5' no traducible del mensajero objeto de estudio.

#### **1.2 Determinar los requisitos estructurales y de secuencia en la 5'UTR que gobiernan la estabilidad del mensajero de *rbcl*.**

Mediante modificaciones en la región 5'UTR del mRNA de *rbcl* que afecten a la forma y/o secuencia de las estructuras secundarias de su extremo 5' se pretende definir las características de secuencia y estructura que dirigen el recambio del transcrito de *rbcl* en el cloroplasto de *C. reinhardtii*.

### **2. Estudio de proteínas que interaccionan con la 5'UTR.**

Se pretende detectar *in vivo* y caracterizar las proteínas que interaccionan con la región 5' UTR y que puedan estar implicadas en la regulación de la estabilidad del mensajero de *rbcl*. Para ello, se va a utilizar una aproximación bioquímica que fije las interacciones proteicas que tienen lugar con la región 5'UTR del transcrito en condiciones en las que el transcrito quimérico es estable y, posteriormente, se analizarán las proteínas detectadas.

### **3. Aproximación inicial al mecanismo de degradación del mRNA de *rbcl*: efecto de la presencia de un extremo 5' libre.**

Se pretende poner de manifiesto si la presencia de un extremo 5' libre en las moléculas de RNA facilita el reconocimiento inicial de las ribonucleasas implicadas en la degradación de los mismos. Para ello, se crearán distintas construcciones con un extremo 5' libre y se analizará su efecto sobre la estabilidad de estos RNAs quiméricos.



## CAPÍTULO 1

Papel de las secuencias 5´ UTR en la expresión génica  
de *rbcL* en el cloroplasto de *Chlamydomonas*  
*reinhardtii*.

## Introducción.

### 1. Transcripción en el cloroplasto.

Aunque la transcripción en el cloroplasto presenta más características comunes con la transcripción procariótica que con la eucariótica, ésta no tiene lugar exactamente como en bacterias. Entre los genes que pasaron a formar parte del genoma nuclear en los eventos de adquisición endosimbiótica del cloroplasto se encuentran algunos que codifican proteínas implicadas en la transcripción en este orgánulo. Existe un control nuclear jerarquizado a través de un gran número de factores nucleares importados al orgánulo. Estas proteínas nucleares regulan la expresión génica, principalmente, a nivel postranscripcional y, en menor medida, a nivel transcripcional. A través de estas proteínas nucleares, las células responden a señales ambientales acomodando la transcripción génica en el orgánulo para adaptarse al medio.

#### 1.1 RNA polimerasas.

Bioquímicamente se han determinado dos actividades RNA polimerasa distintas en cloroplastos de plantas superiores y en el alga verde *E. gracilis*. Una de estas enzimas es la RNA polimerasa codificada en el genoma cloroplástico (PEP). Esta polimerasa es similar a la RNA polimerasa bacteriana, y está codificada por tres genes: *rpoA*, *rpoB* y *rpoC*. En los cloroplastos, el gen *rpoC* está generalmente dividido en dos genes, *rpoC1* y *rpoC2*. *C. reinhardtii* presenta una particular organización de estos genes: los genes *rpoB* y *rpoC1* están divididos. La división de *rpoC1* (*rpoC1a* y *rpoC1b*) tuvo lugar tras la divergencia de las especies del género *Chlamydomonas*, ya que sólo aparece así dividida en *C. reinhardtii* (Maul *et al.*, 2002; Fong y Surzycki, 1992).

Además de las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\beta'$ , la RNA polimerasa bacteriana contiene la subunidad  $\sigma$ , responsable del reconocimiento del promotor. Mediante diferentes subunidades  $\sigma$  puede dirigir la transcripción específica de diferentes promotores. En el núcleo de plantas superiores y algas se ha encontrado una familia génica que codifica esta subunidad tipo  $\sigma$  (*sig1* a *sig6*). Mediante las diferentes subunidades el núcleo controla la expresión génica en el cloroplasto, empleando una u otra para reconocer distintos tipos de promotores en respuesta a distintos factores (luz, tipo de plasto o estadio de desarrollo) (Troxler *et al.*, 1994; Allison, 2000; Kanamaru y Tanaka, 2004). En el

núcleo de *C. reinhardtii* sólo se ha encontrado un gen  $\sigma$ , *rpoD* (Troxler *et al.*, 1994; Allison, 2000; Bohne *et al.*, 2006; Carter *et al.*, 2004). La actividad RNA polimerasa cloroplástica es inhibida en presencia de rifampicina (Surzycki, 1969).

La segunda RNA polimerasa está codificada nuclearmente (NEP) y es una polimerasa con una única subunidad, que presenta homología con la del bacteriófago T7 (Lerbs-Mache, 1993; Hedtke *et al.*, 1997; Bruce y Stern, 2001). En *Arabidopsis thaliana* hay tres genes que codifican esta RNA polimerasa, uno con péptido señal para la mitocondria, otro para el cloroplasto y el otro para ambos compartimentos (Bruce y Stern, 2001; Hess y Borner, 1999).

En *Chlamydomonas*, como en otras algas verdes, no se ha encontrado la homóloga de NEP en el cloroplasto (Carter *et al.*, 2004). Sin embargo, el hecho de presentar distintos tipos de promotores cloroplásticos y un único factor  $\sigma$  nuclear hace pensar que en el cloroplasto de *C. reinhardtii* podría funcionar más de una RNA polimerasa o más factores  $\sigma$  aún por identificar. Sólo se ha comprobado *in vitro* la unión de este factor  $\sigma$  a los dos tipos principales de promotor presentes en el alga (Bohne *et al.*, 2006). En este organismo la maquinaria enzimática que lleva a cabo la transcripción en el cloroplasto está poco caracterizada bioquímicamente, probablemente por la dificultad de obtención de cloroplastos en cantidades suficientes como para llevar a cabo experimentos de actividades enzimáticas. Serían necesarios nuevos estudios para establecer de manera precisa la maquinaria transcripcional del cloroplasto.

## 1.2 Terminación de la transcripción.

En el cloroplasto, en general, se conoce poco sobre la terminación de la transcripción ya que las RNA polimerasas en el cloroplasto transcriben un mRNA primario cuyos extremos serán procesados para formar el RNA maduro (Barkan y Goldschmidt-Clermont, 2000).

En *C. reinhardtii* la mayoría de los mRNAs cloroplásticos presentan en su extremo 3' una región invertida (IR), que forma una estructura en horquilla más relacionada con la estabilidad y el procesamiento del transcrito que con la terminación de la transcripción.

## 2. Elementos de secuencia implicados en la transcripción.

### 2.1 Promotores cloroplásticos.

En plantas superiores las RNA polimerasas NEP y PEP reconocen y utilizan distintos promotores y el desarrollo de cloroplastos fotosintéticamente activos requiere la actividad de ambas enzimas (Hess y Borner, 1999).

La RNA polimerasa cloroplástica reconoce promotores típicos bacterianos ( $\sigma 70$ ) que comprenden dos secuencias consenso, TATAAT y TTGACA, en las posiciones -10 y -35 respectivamente (Gruissem y Zurawski, 1985), y se piensa que transcribe los genes de los fotosistemas I y II en cloroplastos maduros.

La mayoría de los promotores de NEP incluyen el motivo de secuencia 5' C/TG/ATA 3' cerca del inicio de transcripción (Hess y Borner, 1999; Liere y Maliga, 1999; Hajdukiewicz *et al.*, 1997). Esta enzima transcribe en exclusiva genes de la maquinaria de expresión génica en el cloroplasto como *rpo* y *rrn16* (Gruissem *et al.*, 1986). Este promotor se ha encontrado en posición 3' de promotores PEP de muchos genes cloroplásticos, indicando que algunos de éstos pueden ser transcritos por ambas enzimas (Kanamaru y Tanaka, 2004).

La transcripción *in vitro* de genes de tRNA de cloroplastos de espinaca está gobernada por dos tipos distintos de promotores; el primero de ellos es un promotor estándar -35/-10 y el segundo es un promotor interno que, *in vitro* y por sí solo, es capaz de presentar una actividad transcripcional completa (Gruissem *et al.*, 1986).

El último tipo de promotor en cloroplastos de plantas superiores es el caso particular de un promotor de respuesta a la luz azul (BLRP) descrito en el gen *psbD* y que está altamente conservado en plantas superiores. Este gen contiene dos elementos del promotor, uno constituido por el elemento -10, y otro que responde a la luz, constituido por una caja AAG, de 23 pares de bases, localizado entre las posiciones -36 y -57 del inicio de la transcripción (Kim *et al.*, 1999).

En el alga verde *C. reinhardtii* se han encontrado tres tipos de promotores. El primer tipo, definido en el gen ribosómico 16S, es un promotor típico bacteriano  $\sigma 70$ . Este tipo de promotores dirige la expresión de los genes ribosómicos en *C. reinhardtii* y son promotores fuertes (Klein *et al.*, 1992). La segunda clase de promotores presentes en el cloroplasto del alga se caracteriza por la pérdida del elemento -35 y, normalmente, presenta la secuencia consenso -10 extendida,

TATAATAT. Este tipo de promotor se definió inicialmente para el gen *atpB* (Klein *et al.*, 1992) y parece ser el promotor común en los genes que codifican proteínas que participan en la fotosíntesis en el genoma del cloroplasto. El tercer tipo es el promotor interno de una subpoblación de tRNAs del cloroplasto (Jahn, 1992).

## 2.2 Secuencias intensificadoras de la transcripción.

Las secuencias intensificadoras de la transcripción permiten reforzar y regular la transcripción desde un promotor dado. No son comunes en el cloroplasto ya que se han descrito en muy pocos genes. Como resultado de distintos estudios con genes quiméricos en *C. reinhardtii* se ha descrito la presencia de secuencias intensificadoras en la región codificante de *rbcl* y *psbA*. Las regiones promotoras y 5'UTR de estos dos genes no son suficientes para expresar genes heterólogos en el cloroplasto con la misma tasa de expresión que los genes endógenos. Este efecto no es general y en otros genes, como *psbD* o *atpA*, la presencia o ausencia de región codificante no afecta a la expresión de genes quiméricos controlados por las secuencias 5' de estos genes (Anthonisen *et al.*, 2002). Puesto que no existe homología de secuencia entre las regiones codificantes de *rbcl* y *psbA* el efecto intensificador de la transcripción debe de requerir proteínas específicas para cada una de ellas o un factor de reconocimiento general, no específico de secuencia. En el cloroplasto de *C. reinhardtii*, únicamente se ha caracterizado y delimitado con detalle la secuencia intensificadora de *rbcl* (Klein *et al.*, 1994).

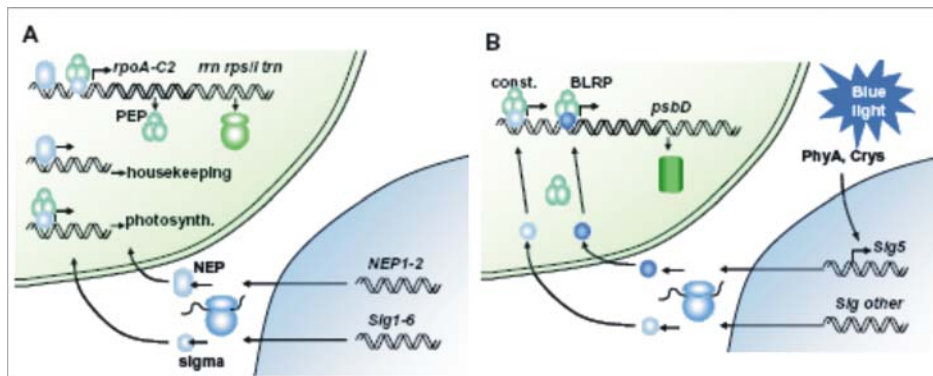
Se ha descrito, mediante genes heterólogos, que un tracto de polinucleótidos A/T en regiones intergénicas puede funcionar como aumentador de la transcripción de un modo inespecífico, probablemente alterando la topología del DNA (Pfannschmidt y Liere, 2005).

## 3. Regulación de la transcripción en el cloroplasto.

La luz tiene un fuerte efecto regulador en la transcripción génica de los plastos ya que todo el metabolismo de los organismos fotosintéticos está basado en la utilización de esta forma de energía. Mediante el estado redox de los componentes de la cadena de transporte fotosintético y de otras moléculas se logra acoplar la expresión de los genes cloroplásticos a la función fotosintética necesaria en determinadas condiciones luminosas (Pfannschmidt *et al.*, 1999).

En plantas superiores existe una regulación por el estado redox de la plastoquinona de la transcripción de los genes *psaB* y *psbA*. Cuando la absorción de luz del fotosistema II es mayor que en el fotosistema I se genera un exceso de electrones que producen estrés oxidativo. Esto se traduce en un aumento del conjunto de moléculas de plastoquinona reducida y, para evitar el estrés, se activa la transcripción del gen *psaB* y reprime la de *psbA*. De este modo, de forma rápida, ajustando la cantidad de mensajero de proteínas de los dos fotosistemas, se aumenta la cantidad de fotosistema I, para aceptar el exceso de electrones, y se reduce la cantidad de fotosistema II que los genera. Esta respuesta de aclimatación a la luz puede estar, además, generada por cualquier circunstancia ambiental que produzca una generación excesiva de electrones altamente energéticos, como, por ejemplo, las bajas temperaturas o el déficit hídrico (Ishizaki *et al.*, 2005).

Basándose en la regulación transcripcional en bacterias, se ha propuesto que, en el cloroplasto, la activación diferencial de factores  $\sigma$  puede proporcionar un mecanismo de control de la expresión de grupos de genes cloroplásticos. En plantas superiores la actividad de PEP resulta crítica para la biogénesis y el mantenimiento de los cloroplastos. Al principio del desarrollo vegetativo la RNA polimerasa NEP transcribe los genes de la maquinaria génica plastídica, incluyendo la transcripción de PEP. La polimerasa cloroplástica junto con SIG 6 (que actúa como principal factor  $\sigma$  de transcripción constitutiva durante el desarrollo temprano de la planta) empieza a transcribir los genes implicados en el ensamblaje del aparato fotosintético (Nagashima *et al.*, 2004). A través del factor SIG 5, la luz de longitud de onda azul o diferentes estreses, como alta intensidad lumínica, bajas temperaturas, alta concentración salina u osmótica (Allison, 2000), inducen la transcripción de *psbD*, activando el promotor BLRP. El aumento de la transcripción de *psbD* y *psbC* contribuye a reparar el daño oxidativo en el fotosistema II. Aún en los cloroplastos maduros la actividad de NEP continúa siendo fundamental. Así pues, los estudios sugieren que el reemplazo de factores  $\sigma$  específicos controla la transcripción plastídica en respuesta a la luz, el tipo de plasto y el estado de desarrollo del mismo (López-Juez y Pyke, 2005).



**Figura 1.1 Expresión génica en el cloroplasto. (A)** Maquinaria genética cloroplástica y contribución a ésta del genoma nuclear. PEP, RNA polimerasa codificada en el cloroplasto; NEP, RNA polimerasa codificada en el núcleo. Photosynth.: fotosíntesis. **(B)** Regulación por la luz azul del gen cloroplástico *psbD*. PhyA; fitocromo A; Crys; criptocromos; BLRP, promotor de respuesta a la luz azul. Figura de (López-Juez y Pyke, 2005).

La RNA polimerasa cloroplástica de plantas superiores presenta una clara preferencia por el DNA superenrollado frente al DNA relajado lo que sugiere que la topología del DNA puede jugar un papel importante en el nivel basal de transcripción de los genes cloroplásticos. En *C. reinhardtii* se ha visto que la estructura del DNA cambia, debido a la acción de topoisomerasas, en respuesta a condiciones externas como la luz (Thompson y Mosig, 1990). Las fluctuaciones en la topología del DNA, controladas endógenamente y no exclusivamente restringidas a las regiones de DNA transcritas, y la especificidad de cada promotor génico pueden proporcionar un mecanismo sencillo de control global de la expresión génica (Salvador *et al.*, 1998).

En *C. reinhardtii* hay evidencias de una regulación transcripcional por ritmos circadianos (Kawazoe *et al.*, 2000). En células crecidas sincrónicamente hay dos tipos de transcripción cloroplástica, una basal, insensible a cicloheximida, y otra inducida por ritmos endógenos, sensible a esta droga. Los ritmos circadianos inducen un pico diario de transcripción que ocurre al principio del período luminoso en *tufA*, *rbcL*, *atpA* y *atpB* (Salvador *et al.*, 1993b; Hwang *et al.*, 1996;

Carter *et al.*, 2004). En el cloroplasto del alga también existe una regulación transcripcional por la luz, como en el caso del gen *psaB* (Salvador *et al.*, 1993b).

#### 4. El promotor básico de *rbcl* en *Chlamydomonas reinhardtii*.

En plantas superiores el gen *rbcl* es transcrito por la RNA polimerasa codificada por el cloroplasto desde un único promotor. Se asemeja a un promotor típico procariota y contiene las cajas -10 y -35 conservadas (Gruissem y Zurawski, 1985). En *C. reinhardtii*, sin embargo, es similar al promotor bacteriano  $\sigma$  70 pero sólo está constituido por una caja TATA extendida (TATAATAT), localizada en torno a la posición -10 (figura 1.2) (Klein *et al.*, 1994). Además presenta un elemento intensificador, delimitado entre las posiciones +108 y +143, que aumenta la tasa de transcripción de este gen al menos 10 veces (Klein *et al.*, 1994; Singh *et al.*, 2001; Anthonisen *et al.*, 2002). Otros estudios también apoyan la presencia de este intensificador de la transcripción *in vivo* (Kasai *et al.*, 2003).

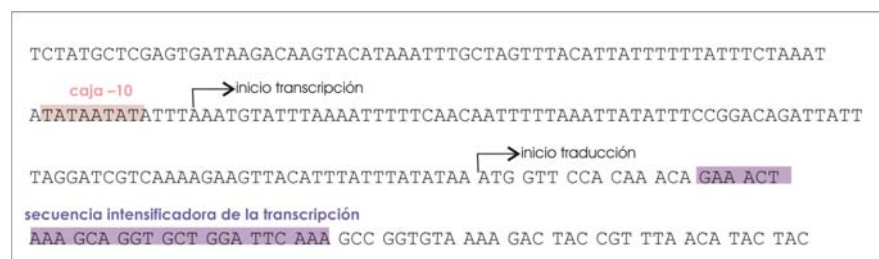


Figura 1.2. Promotor de *rbcl* en el cloroplasto de *C. reinhardtii*.

En el cloroplasto de tabaco el promotor básico de *rbcl* es suficiente para transcribir el gen a su máxima tasa de transcripción, sugiriendo que la función intensificadora de la región codificante de *rbcl* debe de ser exclusiva de *C. reinhardtii* (Eibl *et al.*, 1999).

Se ha descrito un mutante de *C. reinhardtii* (76-5EN), no fotosintético, que no presenta la holoenzima Rubisco debido a una deficiencia en el mRNA de *rbcl*. Esta mutación nuclear no causa efectos fotosintéticos pleiotrópicos y afecta, únicamente, a la expresión de la subunidad grande de la Rubisco. La subunidad pequeña parece sintetizarse casi a la tasa normal aunque como consecuencia de la ausencia de la subunidad grande se degrada. En el mutante 76-5EN la



cantidad de transcrito de *rbcl* es menor que en la cepa silvestre. Este mutante parece tener alterada la tasa de transcripción de este transcrito específico, sin que presenten afectada su estabilidad (Hong y Spreitzer, 1998). Sin embargo, no es habitual encontrar mutantes nucleares que tengan afectada la expresión de un transcrito cloroplástico en concreto, ya que la maquinaria de transcripción cloroplástica está codificada principalmente en el orgánulo y ese tipo de mutaciones afectarían a la transcripción de todos los genes.

Con objeto de definir el promotor de *rbcl* en *C. reinhardtii* se llevaron a cabo delecciones seriadas de la región 5' del gen *rbcl* desde la posición -70 a +292. Una tanda de delecciones en sentido 5' → 3' permitió delimitar el extremo 5' del promotor como la caja -10 extendida. Mediante el conjunto de delecciones 3'→5', se observó una pérdida de transcripción del gen quimérico en todos aquellos transformantes que no albergaban los primeros 63 nucleótidos de la región no traducible (Klein *et al.*, 1994). Esto sugería que el promotor de *rbcl* queda delimitado entre las posiciones -18 y +63. Por tanto, el promotor podría estar constituido por el promotor básico en torno a -10 y un elemento del promotor en la región 5'UTR. Estudios posteriores similares, basados en delecciones y en la determinación de la abundancia del transcrito y medidas de la velocidad de transcripción *in vivo*, permitieron acotar la región necesaria por el extremo 3' hasta la posición +36 (Salvador *et al.*, 2004).

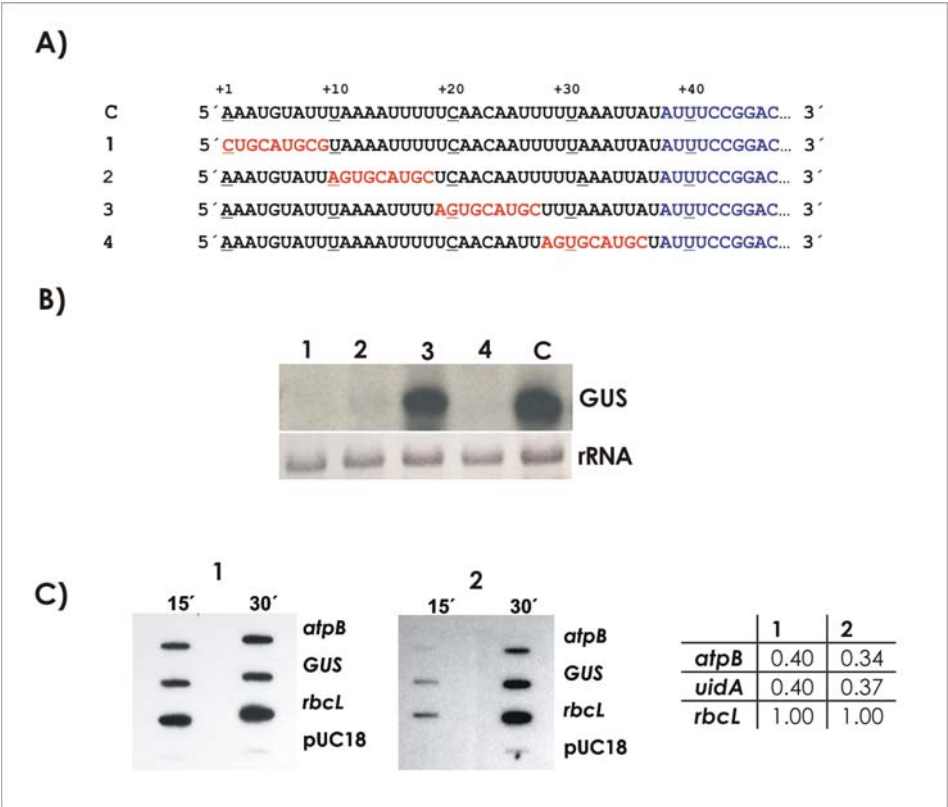
La ausencia de transcripción de los genes reporteros portadores de estas delecciones hasta +36 apunta la idea de la existencia de un elemento del promotor, ubicado entre +1 y +36 de la 5'UTR. La presencia de un elemento del promotor después del inicio de la transcripción de *rbcl* representaría un nuevo tipo de promotor no descrito hasta el momento en *C. reinhardtii*.

### Resultados.

Con el fin de delimitar la existencia de un elemento del promotor en la región 5'UTR de *rbcL* se llevaron a cabo 4 modificaciones secuenciales de esta región. En cada una de éstas se mutó un bloque de 9 pares de bases, barriendo la secuencia de la 5'UTR desde +1 hasta +36. Así pues, los cambios secuenciales llevados a cabo fueron desde +1→+9 (construcción 1), +10→+18 (construcción 2), +19→+27 (construcción 3) y +28→+36 (construcción 4) (figura 1.3.A).

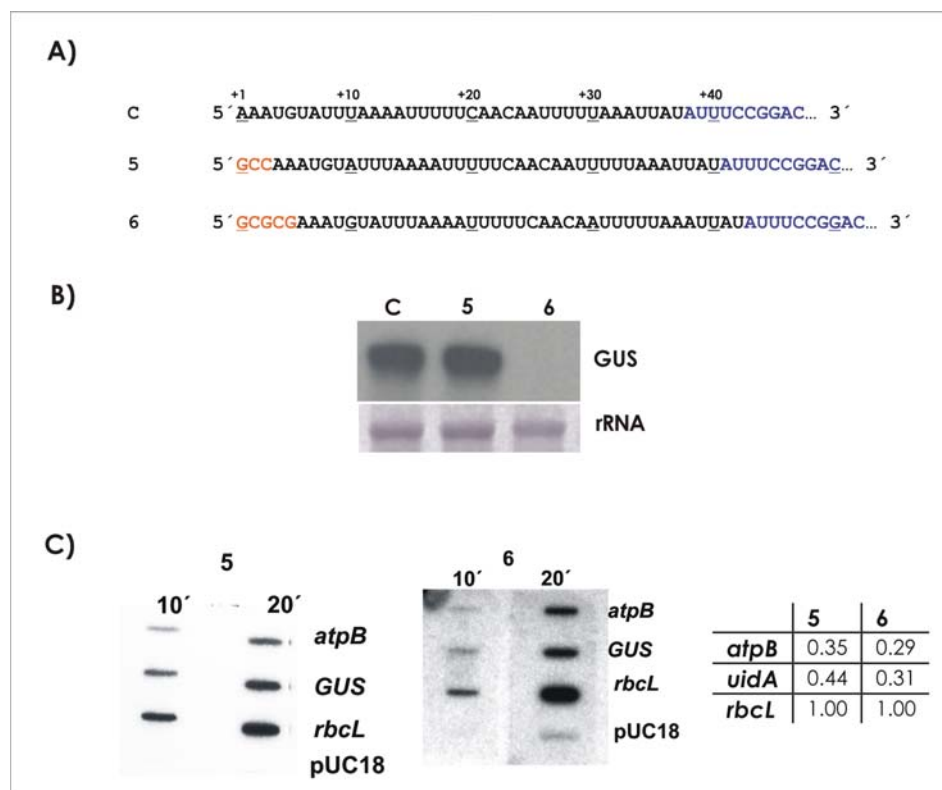
Se analizó mediante Northern blot la abundancia de mensajeros químicos de estas construcciones comprobando que sólo las células con la construcción 3 presentan cantidades de transcrito detectables (figura 1.3.B). Se comprobó si la ausencia de transcritos químicos en los transformantes 1, 2 y 4 es debida a un efecto sobre la transcripción, determinando la velocidad de transcripción *in vivo* de dos de los transcritos que no se acumulan (1 y 2). En la figura 1.3.C se puede observar que ambos genes se transcriben. Aunque la tasa de transcripción es menor que la del gen endógeno *rbcL* (40% y 37% respectivamente) es del orden de la observada para el gen endógeno *atpB*, por lo que debería ser suficiente para detectar los transcritos (figura 1.3.C). Por lo tanto, los resultados parecen indicar que estas modificaciones afectan a la estabilidad de los transcritos y que una menor estabilidad es la causa de que los transcritos no se acumulen.

Se realizaron dos tipos de aproximaciones distintas con objeto de corroborar el resultado obtenido. Ambas ahondan en que la ausencia de transcritos con modificaciones en la 5'UTR no se debe a un efecto sobre el promotor sino sobre la estabilidad de los transcritos. Para ello, en primer lugar, se aumentó la distancia entre el elemento del promotor básico (caja -10) y el hipotético elemento localizado en la 5'UTR ya que estudios en *E. coli* han comprobado que es esencial para la tasa de transcripción mantener la distancia entre la caja -10 y la caja -35, y sólo con aumentar esta distancia en 2 pares de bases la transcripción decae en un 85% (Mandecki y Reznikoff, 1982; Stefano y Gralla, 1982). Se introdujeron 2 secuencias espaciadoras, de 3 y 5 nucleótidos respectivamente, creando dos nuevos transformantes de *C. reinhardtii* (construcciones 5 y 6) (figura 1.4.A).



**Figura 1.3. Función de la 5'UTR en la transcripción del gen *rbcL*** **A)** Secuencia del extremo 5' del mRNA de *rbcL* de *C. reinhardtii* y de las modificaciones 1, 2, 3 y 4 de la 5'UTR de *rbcL*. En rojo los nucleótidos modificados. Los nucleótidos resaltados en azul indican el elemento de estabilidad descrito en Anthonisen *et al.*, 2001. **B)** Abundancia de los transcritos quiméricos modificados y del control. En cada carrera se cargaron 4 µg de RNA total. La sonda utilizada corresponde al gen *uidA* marcada con P<sup>32</sup>. La banda inferior corresponde al RNA ribosómico mayor en el gel, como control de carga. El control presenta una construcción quimérica con la 5'UTR silvestre del gen *rbcL* desde -70 hasta +157 (promotor *rbcL* - 5'UTR *rbcL* - 66 pares de bases de la región codificante) fusionado a la región codificante de GUS. **C)** Velocidades de transcripción de los genes quiméricos con las modificaciones 1 y 2. Normalización de la tasa de transcripción con el gen endógeno *rbcL* y teniendo en cuenta la longitud de los transcritos.

En el Northern blot se puede observar la acumulación de transcritos de 5 pero no los transcritos derivados de la construcción 6 (figura 1.4). A pesar de que la cantidad de transcritos portadores de la modificación 6 no se detecta en el Northern, la medida de la velocidad de transcripción *in vivo* indica que, en las condiciones estudiadas, este gen se está transcribiendo (figura 1.4.C).



**Figura 1.4. Efecto del aumento de la distancia entre el promotor básico y el hipotético elemento del promotor. A)** Secuencias modificadas de la 5'UTR (5 y 6) en las que se ha aumentado la distancia entre la caja -10 y el inicio de la transcripción de la secuencia silvestre con 5 y 3 pares de bases, respectivamente. **B)** Northern blot de las modificaciones 5 y 6. **C)** Velocidades de transcripción *in vivo* de 5 y 6. Más detalles figura 1.3.

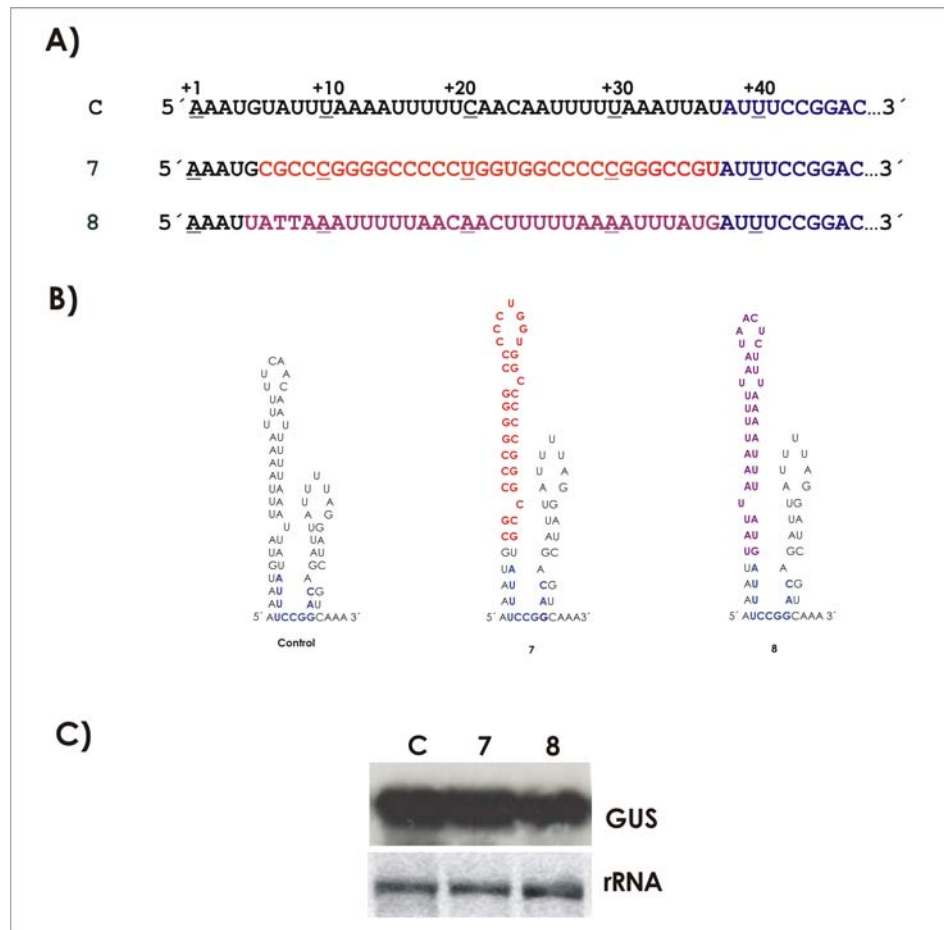
La transcripción de estos mensajeros quiméricos no se ve anulada, a pesar del aumento de distancia entre la caja -10 y el inicio de la transcripción en la secuencia silvestre y aunque la tasa a la que se transcriben se ve disminuida debe de ser suficiente para ser detectados, ya que es incluso mayor que la del gen endógeno *atpB* (figura 1.4.C). Estos resultados apoyan de nuevo que es un cambio en la estabilidad de los transcritos quiméricos, y no la falta de transcripción, la razón por la que éstos no se acumulan.

Se ha resaltado el papel que, en general, presentan las estructuras secundarias en el extremo 5' de los mensajeros procariotas y cloroplásticos en la estabilidad de sus mRNAs (Higgs *et al.*, 1999; Zou *et al.*, 2003). Además, en el

caso particular de *rbcl*, se ha descrito un elemento de estabilidad, localizado en la 5'UTR de *rbcl*, esencial para la estabilidad del mRNA de *rbcl* en *C. reinhardtii* (Anthonisen *et al.*, 2001). Por ello, la segunda aproximación, para confirmar los resultados previos, consiste en modificar parte de la secuencia de la 5'UTR manteniendo todos los elementos importantes para la estabilidad de los transcritos, con objeto de obtener transcritos que, alterando la secuencia del posible elemento del promotor, no presentaran afectada su estabilidad. Para ello, se realizaron 2 nuevas modificaciones. En la construcción **7** se sustituyeron todas la adeninas por guaninas, y viceversa, y todas las timinas por citosinas, y viceversa, desde las posiciones +6 hasta +36 (figura 1.5.A). Las 5 primeras pares de bases no se modificaron para mantener la secuencia y conformación del elemento de estabilidad. Los transformantes cloroplásticos portadores del transgen **7** presentan la misma estructura secundaria que la 5'UTR silvestre pero su secuencia es completamente distinta (figura 1.5.B).

En estos transformantes la abundancia del mensajero del gen quimérico es fácilmente detectable mediante un análisis Northern blot, demostrando que el transgen se transcribe y sugiriendo que no hay presente en esa región ningún elemento del promotor esencial para la síntesis de los mensajeros del gen *rbcl*: GUS (figura 1.5.C).

La secuencia de mRNA del gen quimérico **7**, a diferencia de su homólogo silvestre, presenta un mayor contenido en G y C. Esto podría alargar la vida media de los transcritos por un aumento de la estabilidad de la estructura secundaria. En ese caso podrían detectarse los transcritos por Northern blot aunque presentaran una tasa de transcripción severamente afectada. Para descartar este efecto se realizó otro transformante con otra modificación en la 5'UTR. En la construcción **8** también se ha cambiado completamente la secuencia comprendida entre +5 y +37 al invertir esta secuencia del gen silvestre (figura 1.5.A y B). De este modo la secuencia cambia pero el número de puentes de hidrógeno presentes en la estructura secundaria de los transcritos de *rbcl* permanece inalterado. Los transcritos quiméricos expresados *in vivo* por estos transformantes también se acumulan normalmente y son fácilmente detectables por Northern blot (figura 1.5.C).



**Figura 1.5. Efecto sobre la abundancia de transcritos debido a modificaciones de parte de la secuencia de la 5'UTR. A)** Secuencia del extremo 5' del mRNA de *rbcL* de *C. reinhardtii* y de las modificaciones de la secuencia comprendidas entre +6 y +36, 7 y 8. **B)** Estructuras secundarias de la 5'UTR con las modificaciones descritas en **A**. **C)** Abundancia de transcritos quiméricos modificados y del control. Para más detalles figura 1.1.

Todos los resultados obtenidos con todas las modificaciones descritas (figuras 1.3, 1.4 y 1.5) indican que no debe de existir ningún elemento del promotor en la región 5'UTR de *rbcL*. Lo que a primera vista podría parecer ausencia de transcripción es en realidad falta de estabilidad de los transcritos. Se ha comprobado que los mensajeros quiméricos se transcriben pero algunos de ellos no alcanzan cantidades detectables, lo que indica que presentan un defecto importante en su estabilidad.

### Discusión.

El promotor completo de *rbcl*, el promotor básico con la secuencia intensificadora que reside en el principio de la región codificante del propio gen, es uno de los promotores que más activamente transcribe mensajeros de proteínas en el genoma cloroplástico de *C. reinhardtii*. Los resultados aquí presentados acaban de caracterizar y definir la estructura básica del promotor de *rbcl* en *C. reinhardtii*. Esta caracterización es esencial para la manipulación agronómica, tanto para la expresión de la propia enzima Rubisco como para el empleo de este promotor fuerte en la expresión de proteínas heterólogas.

La abundancia de un transcrito depende del balance entre sus tasas de síntesis y de degradación. La velocidad de transcripción de los genes quiméricos analizados, aún viéndose mermada, es mayor o igual a la de un gen endógeno, *atpB*, lo que indica que debería de ser suficiente para que los transcritos se acumulen en cantidades detectables mediante Northern blot. La vida media de los transcritos heterólogos, constituidos por la región 5' no traducible de *rbcl* y la pauta abierta de lectura del gen *uidA*, es de 5 horas en oscuridad y alrededor de 20 minutos en condiciones lumínicas (Salvador *et al.*, 1993b). Por lo tanto, si los mRNAs quiméricos aquí estudiados se transcriben pero no se detectan mediante Northern blot es porque tienen afectada su estabilidad.

El ensayo para medir la velocidad de transcripción *in vivo* mide la incorporación de fosfato inorgánico marcado con  $^{32}\text{P}$  a los mRNAs tras 10 y 20 minutos de incubación con el radioisótopo. Si la vida media de un transcrito quimérico en concreto es inferior a 10 minutos, el ensayo de velocidad de transcripción *in vivo* indicará que no hay transcripción, aún cuando los transcritos se sintetizan a la velocidad normal. El problema es que éstos no se acumularán a una tasa compatible con el tipo de análisis llevado a cabo. Los transcritos con la 5'UTR de *rbcl* modificada deben presentar una vida media inferior a 10 minutos, es decir, se degradan 50 veces más rápido que un transcrito con la 5'UTR silvestre (Salvador *et al.*, 2004).

Por otra parte, una serie de evidencias apuntan a la importancia de la distancia entre los elementos del promotor, entre la caja -35 y la secuencia -10. El aumento en dos pares de bases de esta distancia es causa suficiente para afectar notablemente la transcripción de un promotor tipo  $\sigma 70$  en *E. coli*

(Aoyama *et al.*, 1983). Sin embargo, en los transcritos obtenidos de las construcciones 5 y 6 no se anuló la transcripción de los mismos aunque se aumente la distancia entre la caja -10 y el putativo elemento del promotor localizado después de +1 en 3 y 5 pares de bases, respectivamente. Esto parece indicar que la transcripción de los mismos no requiere el reconocimiento por parte de la enzima de los dos elementos, la caja -10 y el posible elemento del promotor en la 5'UTR. Asimismo, el hecho de adicionar pares de bases entre estos dos elementos *cis* de reconocimiento cambia también la secuencia del principio de este putativo promotor sin anular el proceso de transcripción.

Los datos obtenidos sugieren que en esta región (desde +1 hasta +36) no se localiza ningún elemento del promotor ya que ni su secuencia ni la distancia entre el promotor básico y el putativo elemento del promotor es esencial para que la transcripción tenga lugar. Por tanto, lo que a primera vista podría parecer una falta de transcripción de los mRNAs es, en realidad, una falta de estabilidad de los mismos. Estos transcritos son tan poco estables que no es posible observar su acumulación en el tiempo empleado para medir la velocidad de transcripción *in vivo* en estos transformantes (Salvador *et al.*, 2004). Esta idea se ve reforzada por el hecho de que transcritos con modificaciones de la 5'UTR que mantienen inalterados los elementos necesarios para su estabilidad no ven afectada su abundancia.

Podría ser que la ausencia de transcripción detectada en otros casos, como por ejemplo en el mutante 76-5EN (Hong y Spreitzer, 1998), se debiera al resultado de medir la velocidad de transcripción de unos transcritos muy inestables. Existe un gran número de estudios en los que se concluye que la ausencia de transcritos es debida a la falta de transcripción. Puede que en algunos de éstos la ausencia de transcrito sea en realidad debida a la forma empleada para medir la velocidad de transcripción. Como en los casos aquí presentados, si un transcrito es muy inestable, en el pulso de 10 minutos de síntesis radiactiva de RNA podría no verse la misma acumulación de transcrito que en las células silvestres. En el caso del mutante de *rbcL* 76-5EN, mediante cruces genéticos se determinó que la mutación afectaba a un gen nuclear. Podría tratarse de una proteína nuclear que se una al transcrito y medie su estabilidad, protegiéndolo del ataque de las ribonucleasas. La abundancia de transcritos observados en ese estudio podría deberse a un efecto sobre la vida



media de estos transcritos en ausencia de esta protección más que al resultado de una transcripción parcial. Este trabajo resalta la importancia de contemplar la estabilidad de los transcritos de interés a la hora de determinar la velocidad de transcripción, sobre todo cuando se sospeche que los transcritos objeto de estudio puedan presentar afectada su estabilidad.

La secuencia analizada parece importante en el control de la estabilidad y así modula la expresión génica. A la vista de los resultados, la aparente falta de transcripción de un gen dado podría ser equívoca y asignar, en algún caso, un posible control transcripcional de la expresión génica cuando, en realidad, se trataría de un control postranscripcional mediado por la estabilidad del mensajero.

## CAPÍTULO 2

Determinantes estructurales de la estabilidad en la 5'UTR del  
mRNA de *rbcL* en el cloroplasto de *Chlamydomonas*  
*reinhardtii*.

## Introducción.

### 1. Estabilidad de los mRNAs en la regulación de la expresión génica.

El crecimiento y desarrollo normal de un organismo depende de la correcta expresión y regulación de una gran cantidad de genes y de la habilidad para ajustar esta expresión a las condiciones cambiantes del medio. Entre los mecanismos moleculares que modulan la expresión génica cabe destacar la estabilidad de los mRNAs como un modo de control predominante en respuesta a estímulos, tanto intra como extracelulares. Tradicionalmente se ha contemplado que la regulación de la expresión génica en el citoplasma de una célula eucariota depende, principalmente, de procesos transcripcionales pero, en la actualidad, cada vez hay más estudios que señalan la importancia de la estabilidad de los mRNAs como un punto de control fundamental en la regulación de la expresión génica. La estabilidad de los mRNAs afecta a la expresión génica de todos los organismos y la cantidad de un mRNA particular se puede modular modificando su vida media, sin afectar a su tasa de transcripción. Los procesos que determinan la vida media de los mRNAs afectan, por tanto, a la diferenciación y crecimiento celular y a la respuesta de las células a su entorno.

La gran variación en la vida media de los mRNAs, tanto de eucariotas como de procariotas, es la primera evidencia de que la velocidad de degradación de los mensajeros también controla la expresión génica. Otro aspecto que también apoya su importancia es el hecho de que la estabilidad de muchos transcritos cambia en respuesta a distintas variables, como nutrientes, infecciones virales, cambios de temperatura y humedad, distintas etapas del ciclo celular o del desarrollo, expresión de toxinas...(Wang *et al.*, 2002). Recientes estudios de la expresión génica a nivel global, basados en análisis de microarrays, han revelado que el 40-50% de los cambios de expresión génica en respuesta a señales celulares ocurre a nivel de estabilidad de los mRNAs (Garneau *et al.*, 2007). Estas aproximaciones parecen indicar que los mensajeros que codifican proteínas implicadas en los mismos procesos fisiológicos o que forman parte de un mismo complejo multiproteico presentan vidas medias similares y que proteínas con funciones reguladoras presentan mensajeros con un recambio mucho más rápido que proteínas del metabolismo (Wang *et al.*, 2002).

El control de la estabilidad de los mRNAs puede ejercerse a distintos niveles. Existe un control basal centrado en la maquinaria de degradación general de todos los RNAs que se encarga del recambio normal en la célula. Superimpuesto a este control existe otro más preciso, que determina la longevidad específica de cada mRNA, basado en un control específico de secuencia. Existe un tercer nivel de regulación, para aquellos transcritos que responden a estímulos y cuyas vidas medias presentan una gran variación, que determina el ajuste fino de la expresión génica (Gutierrez *et al.*, 1999). La vida media de un mRNA concreto es el resultado de la actividad de esta compleja red de mecanismos moleculares y de la adecuación de la célula a las condiciones del medio.

Hay descritas pocas RNasas y éstas presentan poca o ninguna especificidad por secuencias concretas por lo que la estabilidad de los mensajeros dependerá de la propia molécula de RNA. Puesto que no existe homología de secuencias entre las regiones en las que actúan las RNasas, las estructuras secundarias deben de jugar un papel esencial en el reconocimiento y en la actividad de estas enzimas. Distintas proteínas de unión a RNA (RBP) reconocerán elementos de secuencia específicos. Como respuesta a distintas señales celulares se producirán remodelaciones en los complejos de ribonucleoproteínas (RNP) lo que modificará la vida media de los mensajeros de manera específica pudiendo afectar a grupos de genes fisiológicamente relacionados. El estudio de la estabilidad de los mRNAs se ha iniciado con la búsqueda de aquellos elementos *cis* que hacen a algunos transcritos más sensibles que otros a la maquinaria de degradación.

### **2. Determinantes de la estabilidad de los mRNAs de plantas.**

El control de la estabilidad de los mRNAs probablemente contribuye a la expresión de muchos genes en plantas ya que juega un papel fundamental cuando se requieren respuestas rápidas. La tasa de degradación de los distintos mRNAs en plantas superiores puede variar dentro de un amplio rango y se modula en respuesta a gran cantidad de estímulos, tanto externos como internos. Los transcritos eucariotas son relativamente estables y parece que la estabilidad, más que la inestabilidad, es el estado básico de los mensajeros. En general los mRNAs presentan vidas medias de horas, aunque existen algunos tipos de mRNA que presentan vidas medias mucho mayores o menores. A

menudo, los transcritos más inestables son aquellos que codifican proteínas cuya expresión debe ser finamente regulada. Los estudios sobre estabilidad se han centrado en transcritos especialmente inestables, con vidas medias de menos de 60 minutos, como el mRNA del fitocromo b<sub>6</sub>/f y los transcritos de los genes SAUR (Abler y Green, 1996). La estabilidad de un mRNA particular determina, en gran medida, su abundancia en la célula afectando directamente a la tasa de inducción o represión de su transcripción. Comprender cómo se controla la abundancia de los mRNAs es esencial para optimizar la acumulación de un transgen en plantas con aplicaciones biotecnológicas (Gutierrez *et al.*, 1999).

Los mRNAs eucariotas presentan sus extremos protegidos contra la degradación por exonucleasas. El extremo 5' contiene el primer ribonucleótido modificado (m<sup>7</sup>GpppN) y en el extremo 3' una cola poliA. Además, ambos extremos se asocian con proteínas que contribuyen a esta protección (Meyer *et al.*, 2004). Aunque cada mensajero en concreto presenta una vida media específica se podría decir que, en general, aquellos mensajeros que mantienen las protecciones de sus extremos presentan una mayor estabilidad.

Normalmente, los mRNAs más inestables presentan elementos de secuencia localizados, principalmente, en la región 3'UTR y, menos frecuentemente, en la 5'UTR o incluso en la región codificante (Chen y Shyu, 1995); (Guhaniyogi y Brewer, 2001). Entre los elementos de secuencia (elementos *cis*) más ampliamente estudiados destacan los elementos ricos en AU (AREs), determinantes comunes de la estabilidad en células de mamífero. Son secuencias de 50-150 nucleótidos ricas en adeninas y uridinas, siempre localizadas en regiones 3'UTR de mRNAs de vidas medias cortas, como los que en mamíferos codifican proteínas como ciclinas, citoquinas, factores de crecimiento y proto-oncogenes. En general, su capacidad para fomentar la degradación de los mRNAs reside en el reclutamiento de la maquinaria de degradación por desadenilación del mRNA, ya sea por su unión directa al exosoma o mediada por otros factores proteicos. Estudios recientes señalan que algunas proteínas de unión a AREs promueven la estabilización del mensajero en lugar de su degradación y que la degradación mediada por AREs también puede tener lugar en sentido 5'→3' (Eulalio *et al.*, 2007). Se ha testado la capacidad de los elementos ARES como determinantes de inestabilidad en plantas, con genes quiméricos en tabaco y funcionan como en mamíferos. En el

mensajero de una proteína de pared celular rica en prolina (PvPRP1) se ha definido una secuencia de 27 ribonucleótidos, rica en U, localizada en la 3'UTR. Este mensajero regula su estabilidad ante la presencia de un elicitor de origen fúngico (Zhang y Mehdy, 1994). La región 3'UTR del mensajero  $\alpha$ -Amy3 también contiene elementos ricos en AU que inducen inestabilidad en el mensajero en presencia de glúcidos (Chan y Yu, 1998).

La cola poliA y la modificación de cabecera son las dianas para el inicio de las distintas vías de degradación del mRNA pero además, a través de la unión de distintas proteínas, ambas regiones participan en la traducción, lo que posibilita que ambos procesos se encuentren interrelacionados. Distintos experimentos en levadura apoyan que existe una competición entre la desadenilación y el inicio de la traducción y que secuencias AREs median tanto la desestabilización como la traducción de los mRNAs a través del reconocimiento por distintas proteínas (Meyer *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2002).

En plantas se ha descrito otro elemento de secuencia que, como las secuencias ARES, se localizan en la región 3' no traducible y confiere inestabilidad a los mensajeros que lo contienen. Son los elementos DST, presentes en RNAs pequeños inducidos por auxinas (small auxin up RNA, SAUR), que son de los transcritos más inestables de plantas, presentando vidas medias del orden de 10-50 minutos y que parecen ser exclusivos de plantas (McClure *et al.*, 1989). Estos elementos consisten en aproximadamente 45 ribonucleótidos con 3 dominios altamente conservados, separados por dos regiones variables, en dos de los cuales existen ribonucleótidos esenciales para su efecto desestabilizante (Sullivan y Green, 1996). Se han obtenido mutantes de *A. thaliana* que presentan alteraciones en la abundancia de mRNAs con DST. Mediante aproximaciones genómicas se ha determinado que presentan afectada la vía de degradación de estos mRNAs (Johnson *et al.*, 2000).

En plantas superiores se ha descrito, en algunas regiones 5'UTR de mensajeros nucleares, un elemento *cis* capaz de regular su estabilidad por la luz. Se requieren de 3 a 11 repeticiones de la secuencia CAUU cerca del extremo 5' de la 5'UTR para que estos mRNAs respondan acumulándose en la luz. Uno de estos mensajeros es el del gen *Fed-1* (FERREDOXINA-1). En plantas de tabaco transgénicas, en condiciones de oscuridad, se induce rápidamente una disminución de la estabilidad y de la traducción de cualquier mensajero

quimérico portador de la región 5'UTR de *Fed-1*. La presencia de este elemento incrementa 2.5 veces la acumulación del transcrito quimérico en condiciones lumínicas (Bhat *et al.*, 2004). Además, de forma independiente, la luz incrementa la asociación del mensajero con los polirribosomas, lo cual estabiliza y asegura la traducción del mismo (Dickey *et al.*, 1998).

La presencia de codones sin sentido o codones de parada prematuros en los mRNAs de eucariotas actúa como elementos *cis* que activan un control de calidad que asegura la expresión de mRNAs con la secuencia codificante completa y correcta (Baker y Parker, 2004).

## 2.1 Regulación de la estabilidad de los mRNAs de plantas.

En plantas se ha descrito un control diferencial de la estabilidad de los transcritos como respuesta a distintas señales externas, como la luz. La inducción de la estabilidad del mRNA de *Fed-1* por la luz consiste en un aumento de la estabilidad de los transcritos al pasar de condiciones de oscuridad a condiciones de luz. En el caso del gen  $\alpha$ -Amy3 la represión de su expresión génica está mediada por variaciones de la vida media de su transcrito, pasando de 6 a 1.5 horas al aumentar la concentración de sacarosa en el medio.

Los cambios de estabilidad de los mRNAs también afectan a la respuesta general de la planta a distintas condiciones de estrés. Un mecanismo de defensa de la planta frente al ataque por patógenos, entre otros, consiste en la producción de especies reactivas de oxígeno y otros cambios redox. Un ejemplo bien descrito de esta defensa es la modulación de la estabilidad del mRNA de PvPRP1, que codifica una proteína rica en prolinas de la pared celular. Cuando las células son expuestas *in vitro* a un elicitor fúngico, la proteína PRP-BP se reduce y es capaz de unirse a la 3'UTR del mRNA disminuyendo así su vida media de 60 horas a 18 horas (Zhang y Mehdy, 1994).

Otros tipos de estrés abióticos como el frío, el calor o la salinidad, también parecen ser factores que modulan la estabilidad de los mensajeros de genes implicados. Los transcritos de  $\alpha$ -amilasas ven afectada su vida media en función del calor (Brodli y Ho, 1991) o, en suspensiones celulares de arroz, en función de los niveles de sacarosa (Sheu *et al.*, 1996). Las hormonas juegan un papel fundamental en la regulación del desarrollo y de la fisiología de la planta.

Existen distintos ejemplos en los cuales la base molecular de la acción de la hormona regula la estabilidad de algunos mensajeros. Las citoquininas, el etileno y el ABA, pueden regular la abundancia de mensajeros específicos en distintas especies (Downes y Crowell, 1998; Gutierrez *et al.*, 1999). Finalmente, señalar que en *A. thaliana* el control de la estabilidad de los mRNAs es un factor importante en la expresión por ritmos circadianos de algunos genes concretos (Lidder *et al.*, 2005).

### 3. Determinantes de la estabilidad de los mRNAs procariotas.

Los mRNAs de procariotas, comparados con los de eucariotas, presentan vidas medias más cortas, del orden de minutos (entre 30 segundos y 20 minutos) lo que les permite ajustar con celeridad sus patrones de expresión génica a las condiciones externas continuamente cambiantes. Estudios previos, en *E. coli* y *Bacillus subtilis*, han identificado en las regiones 5'UTR de los mensajeros dos dominios responsables de su estabilización. Uno es la presencia de una estructura secundaria en el extremo 5', cuyas características de secuencia no son relevantes, siempre y cuando formen una horquilla. El otro es el sitio de unión del ribosoma; el alto grado de ocupación del ribosoma de parte de la región 5'UTR contribuye a estabilizar el mensajero al impedir su degradación (Arnold *et al.*, 1998; Hambræus *et al.*, 2002). En bacterias, la vida media de los mRNAs parecen estar fuertemente determinada por las características de las regiones 5'UTR de los transcritos (Hambræus *et al.*, 2002). En estos organismos no se han descrito secuencias específicas en la propia molécula del mensajero que contribuyan a controlar su vida media.

La estabilidad de los mRNAs parece ser dependiente de la accesibilidad de su extremo 5' que supone el anclaje inicial de la maquinaria endonucleolítica (Mackie, 1998). La presencia de una horquilla en el extremo 5' de un mRNA es una constante relacionada con la estabilidad de muchos mensajeros de procariotas y del cloroplasto. En bacterias, es la presencia de esta estructura, y no su secuencia, la que influye en la estabilidad de los mensajeros. Un mensajero extremadamente lábil puede aumentar su estabilidad sólo con la presencia de una estructura secundaria en su extremo 5' (Zou *et al.*, 2003; Emory *et al.*, 1992).

Las estructuras secundarias localizadas en la región 3'UTR de los mensajeros procariotas actúan como terminadores intrínsecos de la transcripción y, además



suponen una barrera física para la actividad exonucleolítica. Sin embargo, esta región no tiene un papel primordial en el inicio de la degradación.

#### 4. Determinantes de la estabilidad de los mRNAs del cloroplasto.

En la actualidad se acepta que la estabilidad de los mRNAs en el cloroplasto está determinada por elementos *cis* que residen en la cadena del RNA y por proteínas *trans* específicas de origen nuclear. Esta interacción protege a la molécula de ataques ribonucleolíticos. Mediante el análisis de mutantes nucleares y empleando técnicas de transformación del cloroplasto se han identificado tanto factores proteicos implicados en la estabilidad como sus respectivas dianas en los propios mRNAs (Nickelsen, 1998).

El primer paso para el estudio de los elementos *cis* implicados en la estabilidad de los mensajeros en el cloroplasto fue la localización de éstos dentro de los mRNAs. Para ello, se llevaron a cabo estudios con genes quiméricos en los cuales se intercambiaron regiones 3'UTR y 5'UTR de distintos genes cloroplásticos. Las evidencias indican que, aunque en casi todas las regiones de los transcritos pueden localizarse elementos que afectan a la estabilidad de los mRNAs, es la región 5'UTR la que rige la acumulación de los mensajeros y de la proteína en el orgánulo (Blowers *et al.*, 1993a; Nickelsen *et al.*, 1994; Higgs *et al.*, 1999).

Los trabajos iniciales llevados a cabo con regiones 3'UTR de mRNAs del cloroplasto en plantas superiores sugirieron que las secuencias en horquilla ahí presentes, al contrario que en bacterias, no funcionan como terminadores de la transcripción. En *C. reinhardtii* se ha visto que delecciones de estas estructuras en genes quiméricos de *atpB* y *psaB* conducen a una drástica reducción de la abundancia de los transcritos indicando que estas secuencias son importantes para la estabilidad de los mensajeros (Lee *et al.*, 1996; Stern *et al.*, 1991). El conjunto de resultados obtenidos en esta alga, mediante genes quiméricos con distintas regiones 3'UTR, muestran que sin esta región se producen pequeñas cantidades de transcritos y que su presencia es necesaria para la acumulación de los mRNAs quiméricos, aunque no dictan su vida media (Blowers *et al.*, 1993b; Barnes *et al.*, 2005). En este organismo parece que la función de la región invertida en 3' es impedir la degradación exonucleolítica del transcrito y procesar correctamente su extremo 3' (Drager *et al.*, 1996; Stern *et al.*, 1991).

En el cloroplasto de plantas superiores hay pocos trabajos que centren el papel de la regulación de la estabilidad de los mensajeros en su región 5'UTR, debido a la dificultad de transformar genéticamente sus genomas. Debido a la facilidad con la que se logra transformar por biolística los genomas cloroplásticos de *C. reinhardtii*, este organismo se convirtió en el organismo modelo principal para estudios moleculares en este orgánulo. El posterior desarrollo de la transformación por biolística de cloroplastos ha permitido ampliar estos estudios a plantas superiores. Por ejemplo, en tabaco, se ha descrito un segmento de la 5'UTR de *rbcl* que contiene una estructura secundaria cuyo papel está relacionado con la estabilidad del transcrito en oscuridad. Cabe destacar que esta estructura en horquilla de la 5'UTR, al igual que toda la secuencia líder del mRNA, están altamente conservadas durante la evolución de las plantas superiores, sugiriendo una posible función *in vivo* (Manen *et al.*, 1994; Shiina *et al.*, 1998). En *C. reinhardtii* existen distintos ejemplos bien documentados de mensajeros de genes del cloroplasto en los que se han identificado elementos de secuencia específicos localizados en la 5'UTR implicados en la estabilidad de los mRNAs. Hasta la fecha, no se han descrito motivos de secuencia comunes. En la tabla 2.1 se muestran distintos elementos *cis* descritos en mensajeros cloroplásticos de *C. reinhardtii*.

Por ejemplo, se han descrito dos elementos *cis* en la región 5' no traducible de *psbD*, requeridos para la acumulación de este mensajero. El primer elemento está localizado dentro de los primeros 12 nucleótidos de la región líder y el segundo se ha localizado en la posición +43. La secuencia de este último elemento presenta una alta complementariedad con la secuencia del extremo 3' del rRNA 16S, por lo que se ha sugerido que la unión al ribosoma protegería al mRNA de la degradación (Arnold *et al.*, 1998; Nickelsen *et al.*, 1999).

Todos los elementos descritos en *C. reinhardtii*, y otras secuencias más largas implicadas en la estabilidad de los mensajeros, como en la del mRNA *rps7* (Fargo *et al.*, 1999), se localizan en estructuras secundarias. Esto parece indicar que, tanto la secuencia como la estructura que éstas adquieren, podrían ser dianas de reconocimiento para proteínas que, mediante su interacción, determinan la estabilidad de los transcritos.

mRNAs	Secuencia elemento <i>cis</i>	Posición	Referencia bibliográfica
<i>rbcL</i>	5'AUUUUUAACAAUU 3'	+14-+27	(Singh <i>et al.</i> , 2001)
<i>rbcL</i>	5'AUUUCGGAC 3'	+38-+47	(Anthonisen <i>et al.</i> , 2001)
<i>atpB</i>	5'AUAAGCGUUAGU 3'	+31-+41	(Anthonisen <i>et al.</i> , 2001)
<i>psbD</i> (1)	5'CACAAUGAUUAA 3'	+1-+12	(Nickelsen <i>et al.</i> , 1999)
<i>psbD</i> (2)	5'UGAGUUG 3'	+43-+49	(Nickelsen <i>et al.</i> , 1999)
<i>petD1</i>	5'UUAGCAAUG 3'	+2-+9	(Higgs <i>et al.</i> , 1999)

**Tabla 2.1. Elementos *cis* de estabilidad descritos en regiones 5' no traducibles de distintos mensajeros cloroplásticos en *C. reinhardtii*.**

Estudios en *C. reinhardtii* con distintos mutantes nucleares ofrecen evidencias adicionales acerca de la relevancia de la región 5'UTR para la estabilidad de los mRNAs cloroplásticos. Empleando genes quiméricos en el fondo genético de distintos mutantes nucleares, se ha establecido la asociación entre proteínas nucleares y sus dianas localizadas en las regiones 5'UTR de algunos mensajeros cloroplásticos. La proteína nuclear alterada no es capaz de estabilizar el transcrito quimérico portador de la 5'UTR de estudio, ya que no puede interactuar con esta región, por lo que el transcrito quimérico es inestable. Estas mutaciones nucleares afectan a la estabilidad de transcritos cloroplásticos específicos, o a más de un mensajero si derivan de un mismo operón génico. Este hecho constata que es en la región 5'UTR de los mensajeros cloroplásticos donde residen los determinantes de su estabilidad. En la tabla 2.2 se describen algunos de estos mutantes y los mensajeros cloroplásticos que *in vivo* presentan alterada su abundancia.

El mutante *nac2-26* es deficiente en la proteína D2, que es la proteína de unión a la clorofila en el centro de reacción del PSII. Presenta afectada específicamente la abundancia del mensajero de *psbD*, mientras que otros mensajeros se acumulan en cantidades normales en la célula (Kuchka *et al.*, 1989). Estudios con genes quiméricos portadores de la región líder de *psbD* fusionada a un gen reportero revelaron que en la región líder del transcrito reside un elemento *cis* diana para la unión de la proteína NAC2 y otra proteína de 47 kDa. La ausencia de NAC2 en las células mutantes hace que el transcrito

endógeno sea inestable. La unión de esta proteína a la región 5'UTR evita la degradación exonucleolítica del transcrito (Nickelsen *et al.*, 1994).

Mutantes nucleares	Transcrito afectado	Referencia bibliográfica
<i>nac2-26</i>	<i>psbD</i>	(Kuchka <i>et al.</i> , 1989)
F16	<i>petD</i>	(Drager <i>et al.</i> , 1998)
222E y GE2.10 *	Grupo génico <i>psbB/T/H</i>	(Sieburth <i>et al.</i> , 1991; Monod <i>et al.</i> , 1992)
MΦ11	<i>petA</i>	(Gumpel <i>et al.</i> , 1995)
MΦ37	<i>petA</i>	(Gumpel <i>et al.</i> , 1995)
<i>thm24</i>	<i>atpB</i>	(Drapier <i>et al.</i> , 1992)
<i>ncc1</i>	<i>atpA</i>	(Drapier <i>et al.</i> , 1992)

**Tabla 2.2. Mutantes nucleares de *C. reinhardtii* que presentan afectada la estabilidad de algún mRNA cloroplástico.** En la tabla se muestra mutantes de proteínas nucleares que interaccionan específicamente con la región 5'UTR del mensajero del cloroplasto cuya estabilidad queda regulada por esta interacción. \* Puede que se trate de mutantes de diferentes alelos de la misma proteína (Nickelsen, 1998).

Resultados similares se han encontrado para el mutante nuclear F16 que falla en la acumulación del transcrito del gen *petD*, por la falta de interacción de la proteína nuclear MCD1 con la 5'UTR de dicho mensajero (Drager *et al.*, 1998). La inserción de una secuencia de poliGs en la región 5'UTR de *petD* fusionada con un gen reportero permite la acumulación del transcrito quimérico en el fondo genético del mutante. Puesto que los tramos de poliGs en el RNA impiden el avance de las exonucleasas, estos datos aportan evidencias acerca de la degradación exonucleolítica 5'→3' del mRNA de *petD* (Drager *et al.*, 1999a). También se ha llevado a cabo el mismo experimento con la región 5'UTR de *psbD* en el fondo genético de *nac2-26* (Nickelsen *et al.*, 1999) y con la 5'UTR de *psbB* en *mbb1-222E*. Estos datos sugieren que podría existir una exonucleasa 5'→3' implicada en la degradación de los mensajeros cloroplásticos (Vaistij *et al.*, 2000). En *C. reinhardtii*, los datos apuntan a un modelo general en el que distintos factores de codificación nuclear se unen de manera específica a la

región 5'UTR de los mRNAs cloroplásticos para protegerlos del ataque de las ribonucleasas.

En el caso del mutante MΦ11, que presenta afectada la estabilidad del mRNA de *petA*, no se conoce qué proteína nuclear tiene mutada pero se ha conseguido complementar la mutación con un fragmento de 18 kb de DNA genómico nuclear silvestre (Gumpel *et al.*, 1995).

El hecho de que los mutantes nucleares descritos en *C. reinhardtii* presenten defectos en la estabilidad de mensajeros concretos contrasta con los efectos más generales que tienen estos mutantes nucleares en los cloroplastos de plantas superiores. Se ha comprobado, además, que los elementos de secuencia localizados en 5' de los transcritos que regulan la estabilidad en plantas superiores (espinaca y trigo) no son capaces de desempeñar la misma función en el cloroplasto de *C. reinhardtii*. Todo esto sugiere que los mecanismos implicados en la estabilidad del mRNA del cloroplasto son distintos en plantas superiores y en *C. reinhardtii* (Nickelsen, 1999; Barkan y Goldschmidt-Clermont, 2000).

#### 4.1 Regulación de la estabilidad de los mRNAs cloroplásticos.

La estabilidad de los mRNAs cloroplásticos en plantas superiores varía durante el desarrollo (Klauff y Gruissem, 1991) y en respuesta a factores externos y ritmos circadianos y lo hace a través de secuencias específicas de los mRNAs implicadas en su vía de degradación (Lidder *et al.*, 2005). El bloqueo de la cadena de transporte electrónico en *C. reinhardtii* mediante distintos compuestos oxidantes o reductores produce importantes variaciones de la estabilidad de los transcritos cloroplásticos, sugiriendo que el transporte electrónico no cíclico, vía transportadores redox, es una señal para la maquinaria de degradación del RNA (Salvador y Klein, 1999). La rápida aceleración de la degradación de los transcritos inducida por la luz apunta a que es un proceso producido por la activación o desactivación de factores ya existentes en el orgánulo (Salvador *et al.*, 1993).

#### 5. Estabilidad del transcrito *rbcl* en *Chlamydomonas reinhardtii*.

Todos los genes cloroplásticos analizados, entre ellos *rbcl*, presentan su máxima tasa de transcripción al inicio del período luminoso y ésta va disminuyendo a lo largo de este período e inicia su recuperación al final del

período de oscuridad. *In vivo*, los transcritos del gen *rbcl* se acumulan a altas concentraciones en el cloroplasto del alga. A lo largo de un fotoperíodo de 12 horas luz -12 horas oscuridad la abundancia del transcrito de *rbcl* es más o menos constante ya que en oscuridad un aumento de la estabilidad de los mismos compensa el descenso de su tasa de transcripción y, en condiciones lumínicas, el aumento de su tasa de transcripción equilibra la inestabilidad de los transcritos (Salvador *et al.*, 1993b). En tabaco también se observa este fenómeno; la menor tasa de transcripción del gen *rbcl* en oscuridad se ve compensada con un aumento de la estabilidad de los mensajeros de forma que se compensan la abundancia del mensajero en luz y en oscuridad (Eibl *et al.*, 1999). Los mensajeros endógenos de *rbcl* en *C. reinhardtii* presentan una vida media de alrededor de 20 horas en oscuridad y unas 5 horas en luz (Salvador *et al.*, 1993b).

Se ha medido la velocidad de transcripción *in vivo* de un gen quimérico, MU7 (5'UTR de *rbcl* : 5 pb de región codificante de *rbcl*: gen *uidA* (GUS): 3'UTR de *psbA*), y se ha comprobado que estos transformantes expresan y traducen el mensajero quimérico (Salvador *et al.*, 1993a). Se observa que la transcripción, aumenta en un 35% al principio del período luminoso, igual que ocurre con el gen endógeno. Estos transcritos quiméricos presentan una vida media de 5 horas en oscuridad y alrededor de 20 minutos en condiciones lumínicas. A diferencia del gen endógeno, la cantidad de estos transcritos sufre un rápido descenso a los pocos minutos de que las células sean iluminadas. Puesto que se ha medido la tasa de transcripción en ese punto del ciclo celular, se puede afirmar que el acusado descenso de mensajeros se debe, exclusivamente, a una disminución de su estabilidad. La región 5'UTR presenta algún elemento responsable de la inestabilidad de los transcritos por la luz (Salvador *et al.*, 1993a).

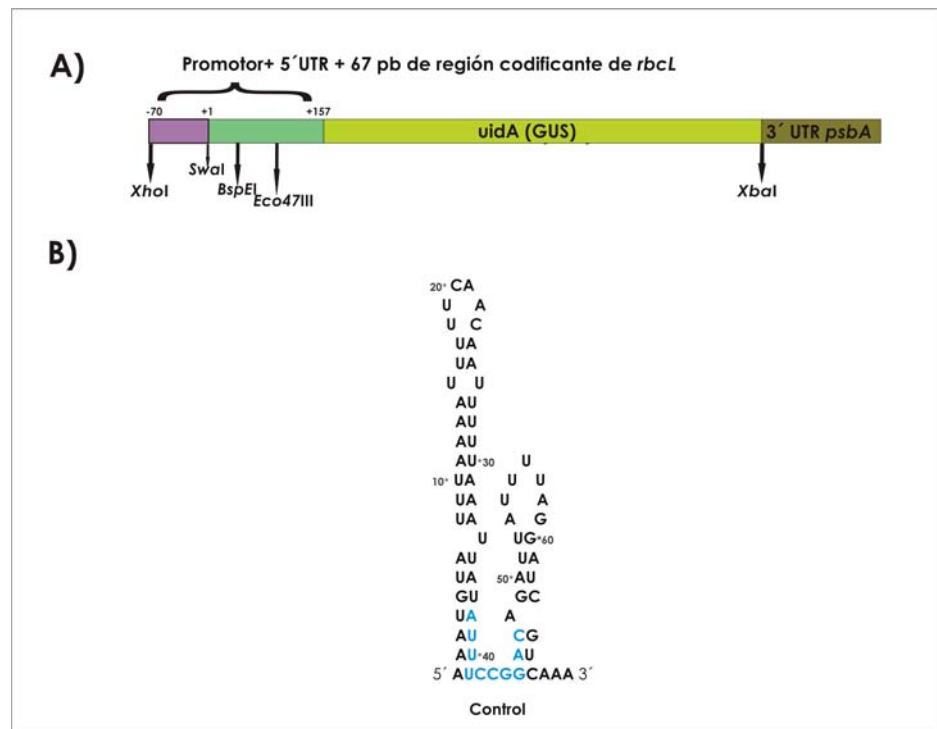
Mediante construcciones quiméricas portadoras de distintos fragmentos del extremo 5' de *rbcl* y el gen *uidA* se delimitó la región mínima de la 5'UTR de *rbcl*, los primeros 63 nucleótidos, como la región esencial para que los transcritos sean estables en oscuridad (Salvador *et al.*, 1993a). Posteriormente, se identificó una secuencia de nucleótidos esencial para la estabilidad de los transcritos quiméricos de *rbcl*, localizada entre las posiciones +38 a +47 de la 5'UTR. El cambio de un único nucleótido de este elemento reduce la vida media de los

transcritos en más del 95% (Anthonisen *et al.*, 2001). Este elemento se extiende formando parte de las bases de dos estructuras secundarias adyacentes (figura 2.1).

La regulación por luz y oscuridad de la abundancia de los transcritos de *rbcl* depende de cambios redox en la célula y se ha determinado que está acoplado al funcionamiento de la cadena de transporte electrónico (Salvador y Klein, 1999). Se ha postulado que deben de existir dos elementos de secuencia en el extremo 5' del mRNA de *rbcl* implicados en esta regulación. El primero de ellos se localiza al principio de la región codificante (+297→+350) y estabiliza los transcritos. El segundo de ellos, localizado en la 5'UTR (+14→+27), afecta negativamente a la estabilidad de los transcritos y parece que, interaccionando entre sí, median la regulación redox de la estabilidad evitando el descenso de la cantidad de mensajero *rbcl* endógeno en la luz (Singh *et al.*, 2001).

Sólo se ha encontrado un mutante nuclear no fotosintético, 76-5EN, que presenta alterada la transcripción de *rbcl* y acumula cantidades reducidas de su mensajero. Experimentos de pulso y caza *in vivo* señalan que es un mutante con un defecto en la transcripción (Hong y Spreitzer, 1994) aunque su fenotipo también podría ser debido a un efecto en la estabilidad de los transcritos.

El principio de la región codificante de *rbcl*, los primeros 157 nucleótidos, contienen un intensificador de la transcripción del gen alrededor de la zona +126 (Anthonisen *et al.*, 2002). Por ello, todos los genes quiméricos aquí analizados están gobernados por los primeros 157 nucleótidos del gen *rbcl*, incluyendo así este intensificador de la transcripción y toda la región 5'UTR que gobierna la estabilidad de los transcritos. Los transcritos portadores de esta región mínima presentan cantidades lo suficientemente grandes como para ser detectadas en oscuridad y al principio del período luminoso. De la construcción quimérica +157 (región 5'UTR de *rbcl* hasta +157: gen *uidA* (GUS); 3'UTR de *psaB*) (figura 2.1) derivan todas las modificaciones analizadas en este estudio. La cantidad de transcrito +157 representará el control con el que comparar la estabilidad de los transcritos quiméricos portadores de las modificaciones introducidas en la 5'UTR de *rbcl*.



**Figura 2.1. Gen quimérico control.** **A)** Secuencia del gen quimérico +157 [157 nucleótidos de 5' del gen *rbcl*: gen *uidA*: 3'UTR *psbA*] insertado en el genoma cloroplástico de *C. reinhardtii*. La región 5' del gen *rbcl* usada en todas las construcciones se extiende desde la posición -70 a la posición +157, relativas al sitio +1 de la transcripción. Esta secuencia incluye el promotor del gen *rbcl* (-70→+1), la 5'UTR (+1→+90) y una porción de la región codificante del gen (67 nt) que contiene una secuencia intensificadora de la transcripción alrededor de la posición +126. Los sitios de restricción empleados en la clonación se muestran en la figura. **B)** Estructura secundaria del extremo 5' del transcrito silvestre como predice el programa de plegamiento teórico m-fold y comprobada *in vivo* por alquilación con DMS (Anthonisen *et al.*, 2001).



## Resultados.

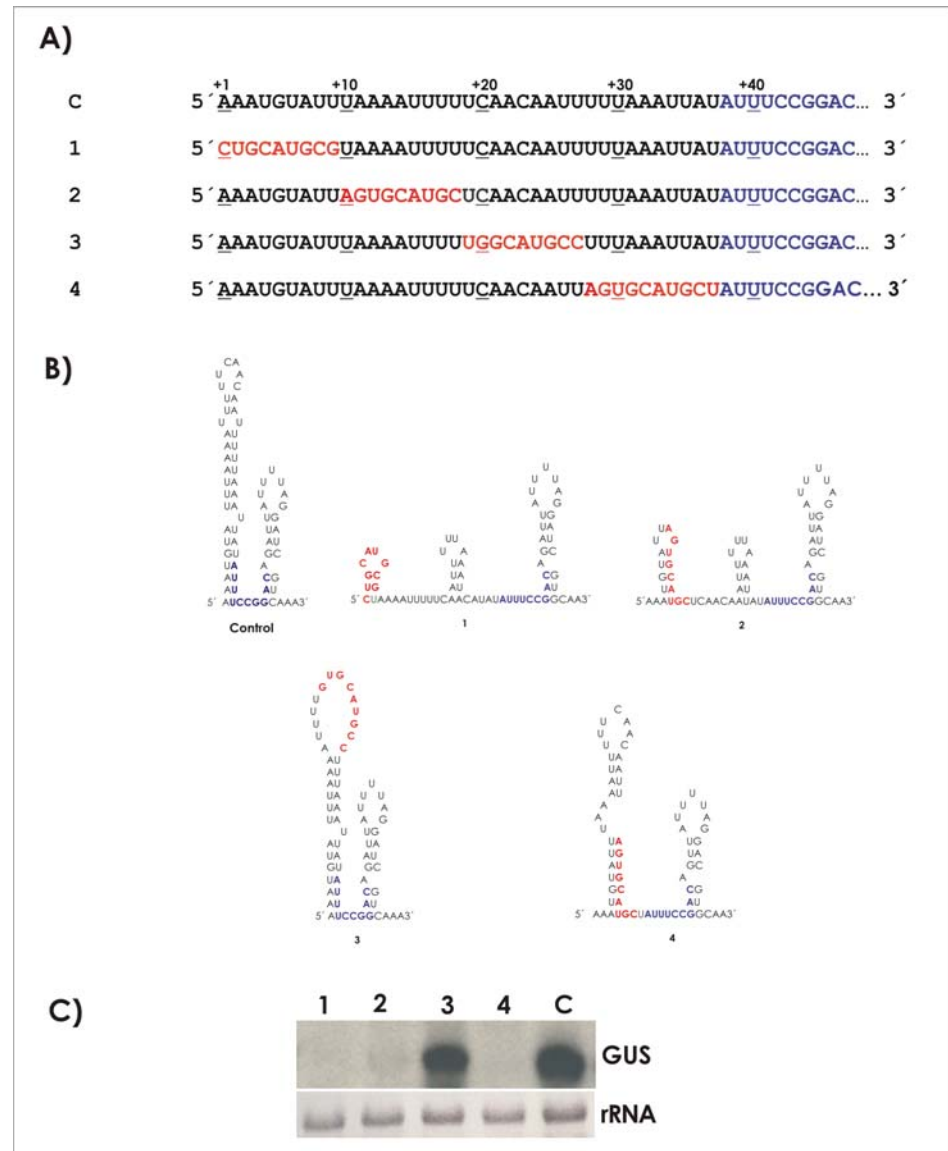
### 1. Función de la primera estructura secundaria de la 5'UTR en la estabilidad de los transcritos.

Se realizaron distintas modificaciones en la región 5'UTR de *rbcl* con objeto de observar el efecto de las mismas sobre la abundancia de los transcritos quiméricos. La cantidad de transcritos modificados se determinó mediante Northern blot, empleando una sonda de la región codificante del gen *uidA* y se compararon con la cantidad de transcrito control +157 portador de la secuencia silvestre. Todas las muestras fueron tomadas a las 11h del periodo de oscuridad.

#### 1.1 ¿Es la secuencia de la primera estructura secundaria esencial para la estabilidad de los transcritos de *rbcl*?

Para determinar si la secuencia de la primera estructura secundaria es relevante para la estabilidad de los transcritos se analizaron 4 transformantes distintos con modificaciones de secuencia en las siguientes regiones: **1** (+1→+9), **2** (+10→+18), **3** (+19→+27) y **4** (+28→+36) dentro de esta estructura. En cada modificación se introdujo un sitio de restricción, para facilitar el seguimiento de la clonación, lo que hizo que algún nucleótido del cambio coincidiera con el existente en la secuencia del gen silvestre. En la figura 2.2 se muestran, tanto las secuencias (**A**) como los plegamientos (**B**), de la secuencia 5' silvestre y de estas cuatro modificaciones. El análisis mediante Northern blot revela que las modificaciones **1**, **2** y **4** no permiten la acumulación de los RNAs quiméricos, indicando que los transcritos resultantes de estos cambios son inestables. Sólo los transformantes de la modificación **3** presentan transcritos quiméricos estables, en cantidades comparables con las del control (figura 2.2.C).

Con objeto de distinguir si los transcritos quiméricos con las modificaciones anteriores son inestables debido a la modificación de la secuencia o a la destrucción de la estructura secundaria del extremo 5' se analizó otra serie de modificaciones que afectan a la secuencia pero mantienen la estructura en horquilla.



**Figura 2.2. Efecto de modificaciones en la secuencia nucleotídica de la primera estructura secundaria de la 5'UTR sobre la estabilidad de los transcritos quiméricos. A)** Secuencia del extremo 5' del mRNA de *rbcl* de *C. reinhardtii* y de las modificaciones realizadas. En rojo se indican los ribonucleótidos modificados y en azul el elemento de estabilidad (Anthonisen *et al.*, 2001). **B)** Estructuras secundarias de la 5'UTR con las modificaciones descritas en A, obtenidas a partir del plegamiento teórico con el programa m-fold a 32° C (Zuker, 2003). **C)** Abundancia de los transcritos quiméricos con modificaciones y del control. En cada carrera se cargaron 4 µg de RNA total. La sonda utilizada corresponde al gen *uidA* marcada con  $^{32}\text{P}$ . La banda inferior corresponde al RNA ribosómico mayor en el gel, como control de carga.

Todos estos cambios conservan, en la base de la horquilla, los primeros 4 nucleótidos, para mantener intacto el apareamiento con el elemento de estabilidad descrito (figura 2.3.A). En la primera construcción se giró la secuencia entre +5 y +37, quedando el extremo 5' en el 3' y viceversa (8).

Además, se realizó una nueva serie de 3 construcciones en las que se cambió la secuencia sustituyendo cada purina por la purina alternativa (A↔G) y las pirimidinas por el nucleótido pirimidínico alternativo (U↔C). Con estas modificaciones se pretendía delimitar con mayor precisión el efecto de una parte de la secuencia sobre la estabilidad de los transcritos manteniendo exactamente la misma estructura secundaria. La estructura secundaria presenta en la parte superior dos regiones de nucleótidos desapareados, formando dos lazos consecutivos. En la construcción 9, los cambios realizados afectaron sólo a la base en doble cadena de la horquilla hasta el primer lazo de nucleótidos. En 10, se modificó de igual manera pero incluyendo la primera pequeña burbuja y, en 7, se modificó toda la estructura secundaria (figura 2.3.B). En el Northern blot se observa la cantidad de los mensajeros quiméricos de cada transformante. En todos los casos se detectan cantidades de transcritos del mismo orden que en el control (figura 2.3.C).

Los resultados obtenidos con estos mRNAs quiméricos portadores de modificaciones en la 5'UTR indican que los cambios de secuencia de la primera estructura secundaria no afectan a la abundancia de los transcritos quiméricos y que éstos son tan estables como el transcrito portador de la 5'UTR silvestre, siempre que los cambios permitan mantener dicha estructura secundaria.

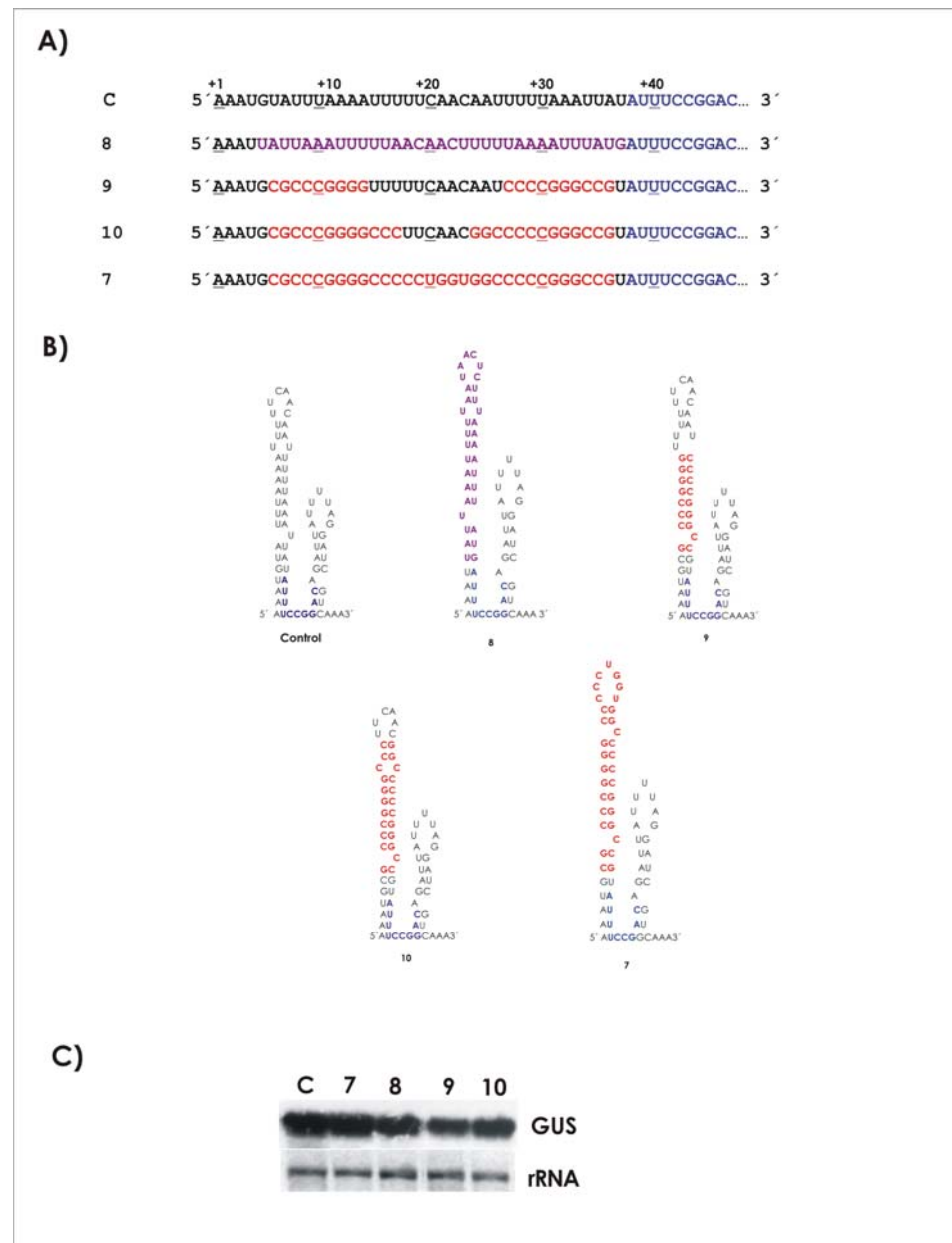
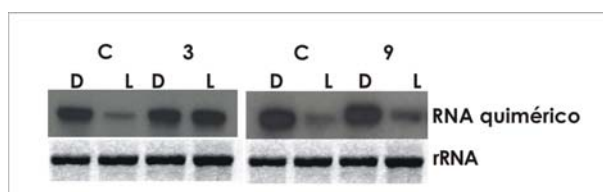


Figura 2.3. Efecto sobre la estabilidad de los transcritos con cambios en la secuencia de la primera estructura secundaria de la 5'UTR que mantienen dicha estructura en horquilla. **A)** Secuencia del extremo 5' del mRNA de *rbcL* de *C. reinhardtii* y de las modificaciones realizadas. **B)** Estructuras secundarias de la 5'UTR con las modificaciones descritas en **A**. **C)** Abundancia de los transcritos quiméricos modificados y del control. Para más detalles figura 2.2.

Como ya se ha descrito en la introducción, la estabilidad de los mensajeros quiméricos gobernados por la región 5'UTR de *rbcl* está sometida a la misma regulación por la luz que la observada en los mensajeros endógenos del cloroplasto. Estos transcritos quiméricos son más estables en oscuridad y cuando las células son iluminadas su abundancia sufre un descenso brusco, que es debido a una disminución de su estabilidad (Salvador *et al.*, 1993a). Aunque no se han mostrado las cantidades de mensajeros al inicio del período luminoso, en todos los transformantes estudiados se ha determinado el comportamiento de los RNAs quiméricos en luz y en oscuridad, para comprobar dicha regulación por la luz. En todos los casos, las modificaciones realizadas mantienen el efecto que la luz tiene sobre la abundancia de los transcritos, con excepción de los transcritos del transformante 3. Los cambios de secuencia introducidos en esta modificación alteran el efecto que la luz tiene sobre la estabilidad de los transcritos, acumulando, después de 1 hora de luz, cantidades mayores de RNA que el control (figura 2.4.A). Esta modificación permitirá profundizar en el estudio de la regulación por la luz de la estabilidad del mRNA de *rbcl*, aspecto no contemplado entre los objetivos de este trabajo.



**Figura 2.4. Regulación por la luz de la estabilidad de los transcritos.** Abundancia de transcritos correspondientes al control y a las modificaciones 3 y 9 en condiciones de 11 h oscuridad (O) y 1h luz (L) de luz de células crecidas en régimen de 12h O/12h L. Para más detalles figura 2.2.

## 1.2 ¿Se requiere la presencia de una estructura secundaria en el extremo 5' de un mRNA estable?

Los resultados anteriores parecen señalar que la presencia de una estructura secundaria en el extremo 5' es importante para conseguir transcritos quiméricos estables en el cloroplasto de *C. reinhardtii*. Para comprobar que el efecto

desestabilizante producido por el cambio de secuencia se debe a la pérdida de la estructura secundaria se llevaron a cabo nuevas modificaciones de la 5'UTR, que se muestran en la figura 2.5.A. En primer lugar, se realizaron dos pequeñas modificaciones en dos porciones distintas de la estructura secundaria. La primera consiste en un cambio de sólo 3 nucleótidos en el tallo de la estructura secundaria (construcción **11**) que desestructura la horquilla del extremo 5' (figura 2.5.B). La otra modificación (construcción **12**) mantiene la estructura secundaria. Se cambiaron sólo 4 nucleótidos que afectan únicamente a la forma del lazo de la horquilla, haciéndolo mayor como ocurre en los transcritos de la construcción **3**, en los que no se ve afectada su estabilidad (figura 2.4.B). Como se observa en el Northern blot (figura 2.5.C), sólo se acumulan los transcritos portadores de la modificación **12**, indicando la importancia de mantener la horquilla del extremo 5' para la estabilidad de los transcritos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente con los transformantes **1** y **2** (figura 2.2), en los que la pérdida de la estructura secundaria también afecta a la estabilidad de sus transcritos.

En segundo lugar, se realizó una nueva construcción para corroborar la importancia de la estructura secundaria en el extremo 5' en la estabilidad de los mensajeros. Se modificó la secuencia de la estructura secundaria complementando los cambios introducidos en el transformante **2** que hacen que la estructura secundaria de 5' quede destruida. Las modificaciones introducidas en **13** permiten recuperar el plegamiento de la estructura en horquilla. Así como la modificación inicial (construcción **2**) no permite la acumulación de los transcritos quiméricos en oscuridad (figura 2.2.C), la nueva modificación (construcción **13**) presenta transcritos estables en oscuridad, debido, probablemente, a la recuperación del plegamiento de la estructura en horquilla (figura 2.5.C). Ninguna de estas modificaciones aumenta el número total de nucleótidos de la 5'UTR.

Sólo los transcritos con modificaciones que les permiten adoptar el plegamiento habitual del extremo 5' se acumulan en el cloroplasto en cantidades comparables con los del control. En todos los casos en los que la secuencia nucleotídica modificada no permite el plegamiento de una estructura en horquilla, la cantidad de transcritos del gen reportero no es lo suficientemente alta como para ser detectada en el análisis (figura 2.2 y 2.5).

Todo parece indicar que la presencia de una estructura secundaria en el extremo 5' es indispensable para la estabilidad de los transcritos quiméricos portadores de la 5'UTR de *rbcl*.

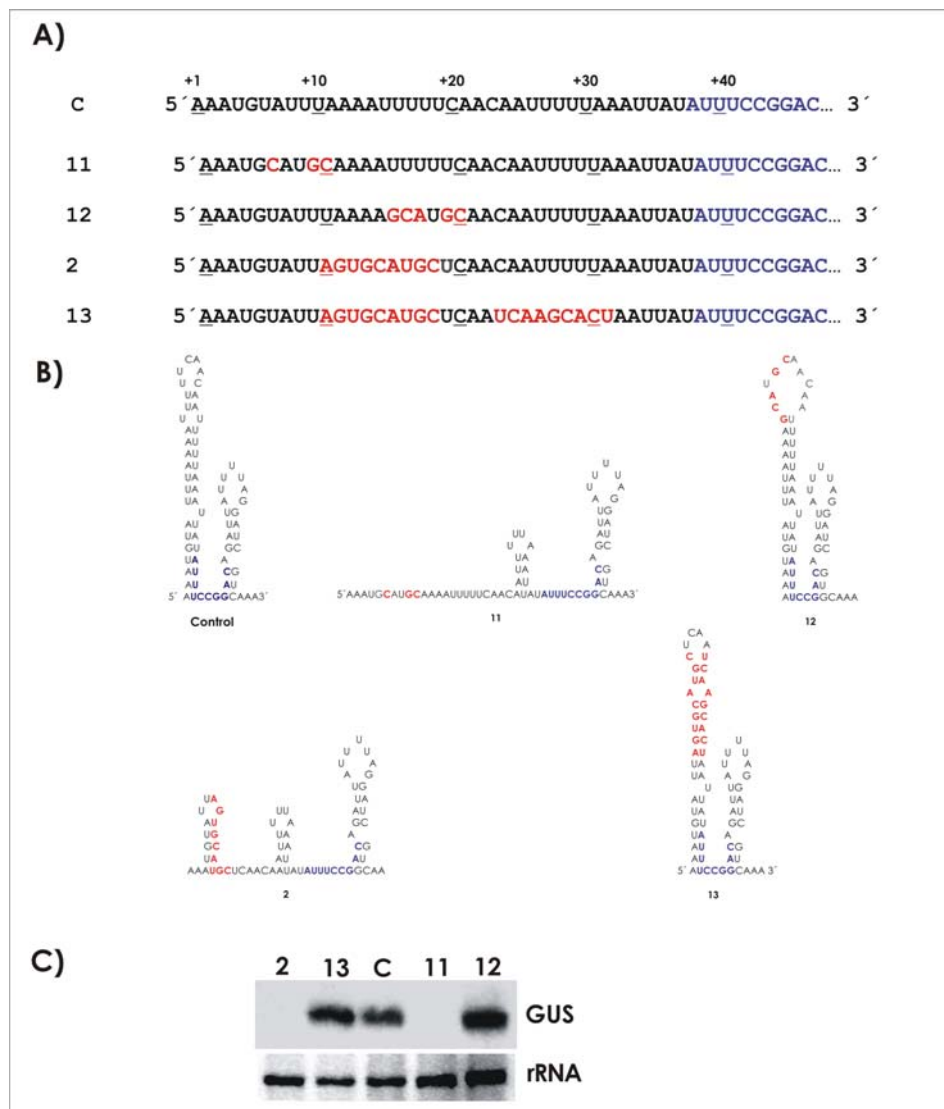


Figura 2.5. Efecto sobre la estabilidad de los transcritos de la presencia de una estructura en horquilla en el extremo 5'. **A)** Secuencia del extremo 5' del mRNA de *rbcl* de *C. reinhardtii* y de las modificaciones realizadas. **B)** Estructuras secundarias de la 5'UTR con las modificaciones descritas en A. **C)** Abundancia de los transcritos quiméricos modificados y del control. Para más detalles figura 2.2.

### 1.3 ¿Cambios en la forma o tamaño de la primera estructura secundaria de la 5'UTR afectan a la estabilidad de los mensajeros de *rbcl*?

Con objeto de averiguar si la primera horquilla puede ser reemplazada por una estructura secundaria con diferente forma o tamaño se llevó a cabo otra serie de cambios en el extremo 5' de la región no traducible. Se crearon nuevas construcciones aumentando (construcción **14**) o disminuyendo (construcción **15**) el tallo de la horquilla en 3 pares de bases. Por último se reemplazó la horquilla silvestre por una estructura secundaria alternativa, completamente diferente en tamaño, secuencia y forma (**16**) (figura 2.6.A y B). Esta última horquilla procede de la región 5' de un mensajero de *E. coli* en la que se ha comprobado que esta estructura estabiliza el mRNA del que procede (Bouvet y Belasco, 1992).

Los transcritos de todos estos transgenes en las algas transformantes se acumulan en cantidades comparables a los del control, a pesar de las diferencias significativas en la forma, secuencia y tamaño (figura 2.6.C). Otras modificaciones realizadas y ya descritas, que también afectan ligeramente la forma de la horquilla (construcciones **3**, **7** y **12**) (figuras 2.2, 2.3 y 2.5), tampoco presentan alterada la estabilidad de sus transcritos, mostrando cantidades de mensajeros comparables al control.



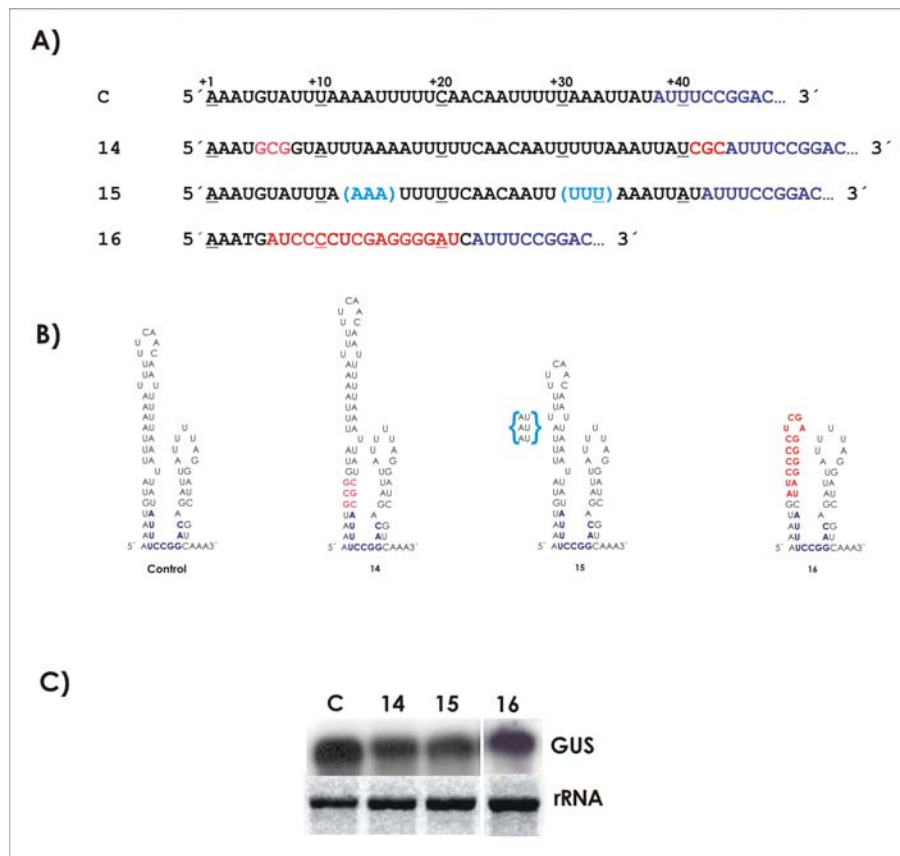


Figura 2.6. Efecto de modificaciones en la secuencia, forma y tamaño de la primera estructura secundaria sobre la estabilidad de los transcritos quiméricos A) Secuencia del extremo 5' del mRNA de *rbcL* de *C. reinhardtii* y de las modificaciones realizadas. B) Estructuras secundarias de la 5'UTR con las modificaciones descritas en A. C) Abundancia de los transcritos quiméricos modificados y del control. Para más detalles figura 2.2.

#### 1.4 ¿Está relacionada la necesidad de la estructura en horquilla con el elemento de estabilidad descrito en la 5'UTR?

Parece que la presencia de una estructura secundaria en el extremo 5' es necesaria para que los transcritos sean estables, aunque su secuencia, forma y tamaño no son relevantes, ya que cambios en este sentido no afectan a la estabilidad de los mensajeros. El hecho de que el elemento de estabilidad descrito en la región 5'UTR de *rbcL* (Anthonisen *et al.*, 2001) forme parte, por sus primeros 4 ribonucleótidos, de la base del tallo de la estructura secundaria del extremo 5' establece una relación directa entre estos dos elementos que

parecen esenciales para la estabilidad de los transcritos quiméricos estudiados. Las mutaciones puntuales que definieron el elemento de estabilidad de esta región podrían deber su efecto al cambio producido en la estructura secundaria de la primera horquilla. A su vez, el efecto de las modificaciones que alteran esta estructura secundaria, aunque mantengan la secuencia del elemento de estabilidad, podría deberse a la afectación de la conformación del mismo (figura 2.1). Con el fin de averiguar si el papel de esta estructura secundaria se relaciona con la conformación que adquiere el elemento de estabilidad descrito en la 5'UTR se introdujeron nuevos cambios en el extremo 5' que modifican la conformación de este elemento. Estos cambios de secuencia y el plegamiento que adquieren las estructuras secundarias resultantes se observan en la figura 2.7.A y B. En primer lugar, para distinguir entre la importancia de la secuencia del elemento de estabilidad o la estructura secundaria del tallo de la horquilla de 5' se llevó a cabo una modificación de la 5'UTR, la construcción **17**, en la que se intercambiaron los nucleótidos desde +1 a +4 por sus complementarios, desde +41 a +38, de la base de la horquilla (figura 2.7). De este modo, se modificó la secuencia del elemento de estabilidad manteniendo la estructura secundaria de 5'. La construcción **18** consiste en la delección de los dos primeros nucleótidos de la región 5' no traducible, lo que produce un acortamiento del tallo, en doble cadena, de la horquilla. Esto altera la configuración del elemento de estabilidad al quedar dos nucleótidos centrales más en simple cadena. La modificación **19** consiste en la extensión de la 5'UTR en 5 nucleótidos capaces de aparear con las posiciones +42→+46. Esto genera una estructura secundaria terminal mayor y más estable que la presente en el mensajero original, provocando a su vez que prácticamente todo el elemento de estabilidad quede en doble cadena (figura 2.7.B).

En la figura 2.7.C se observa que estas 3 modificaciones de la 5'UTR afectan a la estabilidad de los transcritos quiméricos por lo que su abundancia no es detectable por Northern blot. La razón de la inestabilidad de los transcritos resultantes de la modificación **19** podría ser debida a la adición de nucleótidos extra en el extremo 5'.

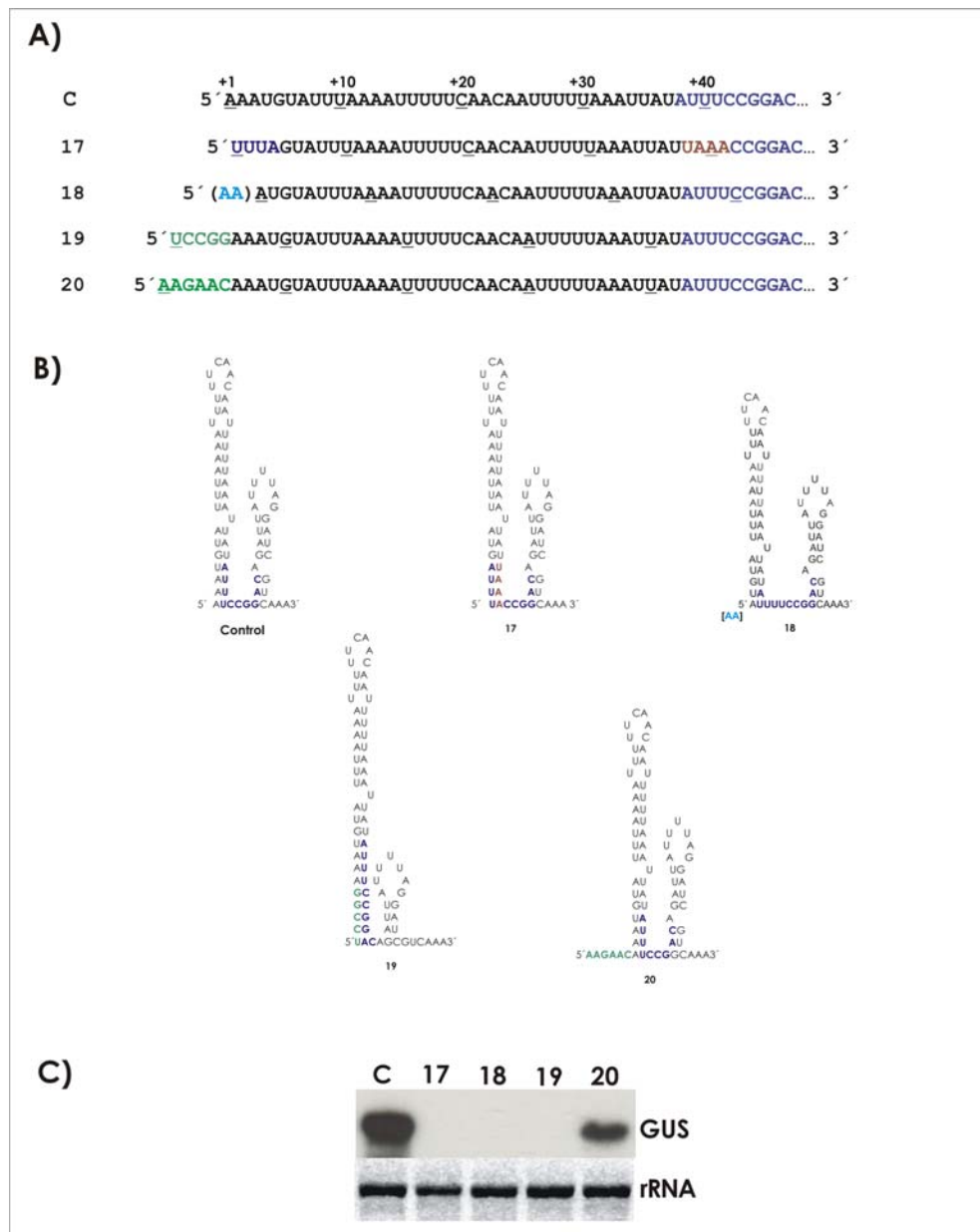


Figura 2.7. Efecto de las modificaciones en la conformación del elemento de estabilidad de la 5'UTR sobre la abundancia de los transcritos quiméricos portadores de dichas modificaciones. **A)** Secuencia del extremo 5' del mRNA de *rbcl* de *C. reinhardtii* y de las modificaciones realizadas. **B)** Estructuras secundarias de la 5'UTR con las modificaciones descritas en A. **C)** Abundancia de los transcritos quiméricos modificados y del control. Para más detalles figura 2.2.

Para comprobar si ésta es la causa de la ausencia de transcritos se llevó a cabo una nueva modificación. Se generó un transformante (**20**) que presenta una cola de 6 nucleótidos desapareados en el extremo 5' del transcrito quimérico y mantiene intactas la estructura y la secuencia de la primera horquilla (figura 2.7.A y B). La diferencia con la modificación **19** radica en que estos ribonucleótidos extra se mantienen libres, según el plegamiento teórico propuesto por el programa m-fold. El resultado del Northern blot revela que, en este caso, las cantidades de transcritos son comparables a los del control (figura 2.7.C). Por tanto, la causa de la inestabilidad de los transcritos de **19** no es la adición de nucleótidos en el extremo 5'.

Los transcritos resultantes de estos últimos cambios (17, 18 y 19) presentan en común el hecho de que el elemento de estabilidad ha perdido su conformación y, por tanto, la inestabilidad de estos transcritos podría deberse a esta causa. La presencia de la estructura secundaria en el extremo 5' del mRNA de *rbcl* parece necesaria para mantener la conformación adecuada del elemento de estabilidad descrito en esta región.

## 2. Papel de la segunda estructura secundaria en la 5'UTR.

En el cloroplasto de *C. reinhardtii* algunos mensajeros presentan en su región líder varias estructuras secundarias. Su función se ha relacionado con la traducción o la estabilidad de los transcritos o, incluso, con ambos procesos a la vez. Las estructuras que se han visto implicadas en la estabilidad de los mensajeros no ocupan necesariamente el extremo 5' de los mismos (Higgs *et al.*, 1999). Ya que en la 5'UTR de *rbcl* existe una segunda horquilla, se ha verificado si en ésta existe algún requisito estructural y/o de secuencia para la estabilidad de los transcritos, para lo cual se llevaron a cabo algunas modificaciones en esta región.

Siguiendo la misma aproximación que en el caso de la primera estructura secundaria, se realizaron construcciones que modificaran sólo la secuencia o la estructura y la estructura de esta segunda horquilla. En estas construcciones se mantuvo el plegamiento del final del elemento de estabilidad en doble cadena, lo que afecta a la base de la segunda horquilla (figura 2.8.B). Los

cambios realizados en la construcción **21** dismantelan la estructura secundaria al perder parte del tallo de la horquilla y quedar toda la secuencia en un lazo (figura 2.8.B). Con esta construcción se comprueba si esta estructura es relevante para la estabilidad de los transcritos. Se realizó una segunda construcción (construcción **22**) en la que se cambió completamente la secuencia manteniendo la estructura nativa de horquilla pequeña. De este modo se comprueba si la secuencia es relevante. En la figura 2.8.C se muestra el Northern blot de estos RNAs quiméricos resultantes y se observa que los transformantes portadores de estos genes quiméricos presentan cantidades equiparables a los del control. Estos datos sugieren que la segunda horquilla, manteniendo en los dos casos la conformación del elemento de estabilidad, no contiene ningún elemento esencial para la estabilidad de los transcritos quiméricos portadores de la 5'UTR de *rbcl*.

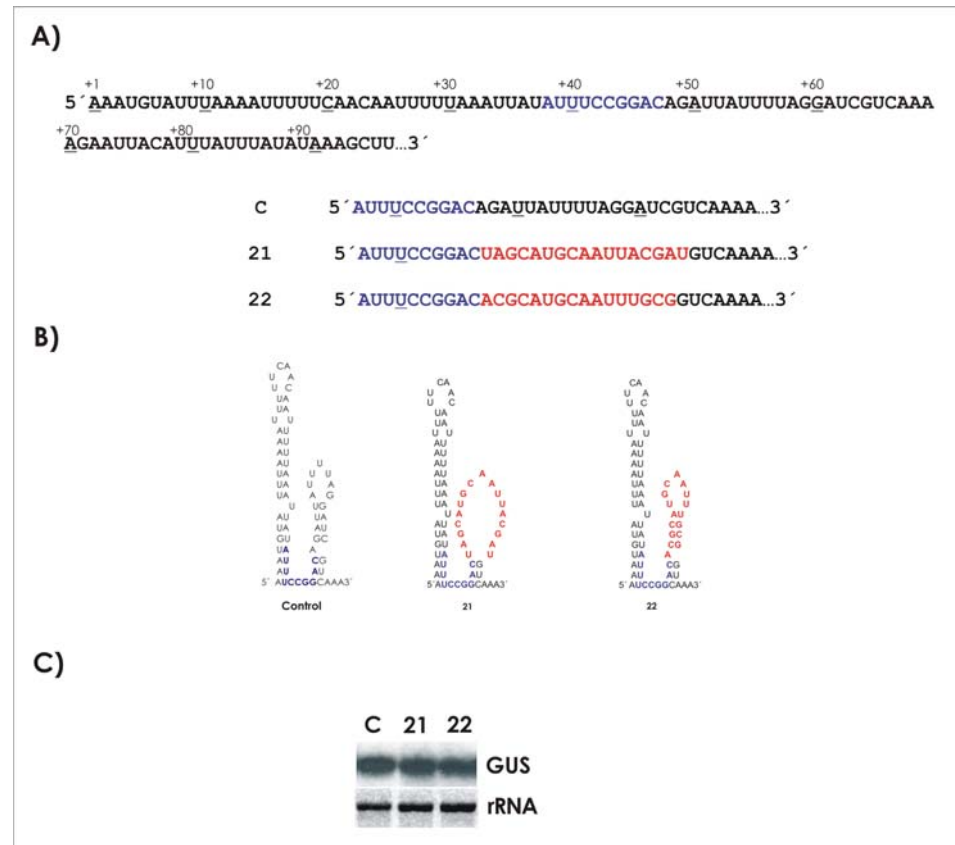


Figura 2.8. Modificaciones de la secuencia y estructura de la segunda horquilla de la 5'UTR y su efecto sobre la estabilidad de transcritos quiméricos correspondientes. **A)** Secuencia completa de la región 5'UTR del mRNA de *rbcl* y secuencia de la segunda mitad de la 5'UTR del mRNA de *rbcl* y de las modificaciones realizadas. **B)** Estructuras secundarias de la 5'UTR con las modificaciones descritas en **A**. **C)** Abundancia de los transcritos quiméricos modificados y del control. Para más detalles figura 2.2.

### Discusión.

#### 1. Abundancia de los transcritos de *rbcl*.

La región 5'UTR de *rbcl* es una buena candidata para profundizar en el conocimiento de los determinantes que regulan la estabilidad de los mensajeros cloroplásticos y modulan la expresión génica en el orgánulo. El promotor de este gen está bien definido, lo que permite controlar la transcripción de genes quiméricos gobernados por esta región (Anthonisen *et al.*, 2001). La región 5'UTR de *rbcl* no sufre procesamiento alguno y está bien caracterizado que sobre ella recae la gobernabilidad de la estabilidad del mensajero, aunque la regulación por la luz no está completamente caracterizada y parece depender también de la región codificante (Salvador *et al.*, 1993b). Además, presenta la gran ventaja de que la región 5'UTR silvestre es fácil de manipular para realizar mutagénesis dirigida ya que presenta un patrón de sitios de restricción que permiten sustituir de forma precisa y controlada la 5'UTR, dada la importancia que el extremo 5' de los transcritos tienen en el proceso que estudiamos.

Las variaciones en la abundancia de transcritos observados en los Northern blots pueden ser debidas a dos motivos distintos. Uno de ellos es que existan diferencias entre transformantes debidas a variaciones en el número total de copias del transgen en los genomas cloroplásticos, es decir, que varíe entre transformantes el porcentaje de homoplasmicidad. En todos los casos se han seleccionado transformantes con, al menos, el 80% de homoplasmicidad, por lo que queda un pequeño margen de variabilidad en el número de copias que podría dar cuenta de pequeñas variaciones entre transformantes. La otra causa puede ser que existan variaciones en la estabilidad de transcritos debido a las modificaciones realizadas en cada transformante. Dado que la estabilidad de los transcritos quiméricos del control es de 5 horas en oscuridad y que en la región 5'UTR no se ha descrito ningún elemento del promotor, la disminución de los transcritos con modificaciones en la 5'UTR las asociamos, exclusivamente, con una disminución de su estabilidad. Por tanto, los cambios en las abundancias de transcritos que no son causados por el grado de homoplasmicidad se pueden asociar a variaciones de la estabilidad de los mismos.

## 2. Papel de la conformación del elemento de estabilidad.

Los resultados obtenidos a partir del conjunto de construcciones químéricas realizadas apoyan la idea de que es necesaria la presencia de una horquilla en el extremo 5' del transcrito. Todos los cambios de secuencia realizados que mantienen la horquilla en 5' generan transcritos estables mientras que si el cambio la destruye los transcritos resultantes son inestables. La importancia de la presencia de una estructura secundaria, sea cual sea su secuencia, se ve reforzada con el análisis de los transcritos con las modificaciones **2** y **13**. La modificación **13** es complementaria a la primera, en el sentido de recuperar la estructura en horquilla original y con ello se recupera la estabilidad de los transcritos. Sin embargo, los transcritos de los transformantes de **18** y **19** poseen una estructura secundaria en el extremo 5', pero su presencia no es suficiente para que éstos sean estables. La causa de la inestabilidad de los mensajeros de **18** y **19** no es la presencia de una horquilla más corta o más larga que la silvestre. Tampoco la adición de ribonucleótidos en el extremo 5' de **19** es responsable de la inestabilidad de sus transcritos ya que este tipo de cambios no afectan a la estabilidad de otros transcritos (figura 2.6 y 2.7). Además, la estructura resultante de los cambios de **19** es más estable que la de la secuencia silvestre y, a pesar de ello, los transcritos no se acumulan en cantidades detectables. Por tanto, la presencia de una estructura secundaria en el extremo 5' no es suficiente para estabilizar los mensajeros. Parece que su presencia es necesaria para mantener la conformación del elemento de estabilidad. Los resultados corroboran la necesidad de una estructura secundaria en el extremo 5' para mediar el plegamiento del elemento de estabilidad. La modificación **17** refuerza la importancia de la secuencia del elemento de estabilidad pues los cambios producidos no afectan a la estructura secundaria de 5', sin embargo, no permiten la acumulación de transcritos.

Con respecto a la estructura secundaria pequeña de la 5'UTR, los datos indican que su conformación o secuencia no gobiernan la estabilidad de los mensajeros de *rbcL*. Existe una construcción previa en la cual se mutó puntualmente el nucleótido +49, cambiando la guanina original por una adenina (Anthonisen *et al.*, 2001). El transcrito resultante de este cambio es estable y la estructura secundaria predicha por el programa m-fold coincide exactamente con la del transcrito de **21**. Por lo tanto, esa construcción supone



un apoyo adicional que confirma que la estructura de la segunda horquilla de la 5'UTR de *rbcl* no es relevante para la estabilidad de los transcritos.

La conformación del elemento de estabilidad debe contener los cuatro primeros nucleótidos, desde +38 hasta +41, en doble cadena quedando las posiciones centrales, +42 (C), +43 (C) y +44 (G), en simple cadena. Las posiciones +45, +46 y +47, se encuentran formando parte de la base de la segunda estructura en horquilla, también en doble cadena. Parece no importar que estos 3 últimos nucleótidos queden plegados en doble o en simple cadena (figura 2.1), ya que una de las construcciones iniciales en el estudio de la 5'UTR del gen *rbcl* contenía sólo los primeros 63 nucleótidos delante del gen reportero *uidA*. En estos transformantes, la conformación del elemento de estabilidad se caracteriza por presentar el extremo 3' en simple cadena y la abundancia de transcritos es comparable con la del gen silvestre (Salvador *et al.*, 1993a). Por tanto, en principio, parece que la conformación que adquiere el elemento debido a la segunda horquilla no es relevante para la estabilidad de los transcritos, pudiendo estar también en cadena sencilla. La primera estructura secundaria obliga al correcto plegamiento de la secuencia del elemento de estabilidad del RNA y su presencia está justificada por este motivo. Por sí misma no evita la degradación del mRNA.

La compleja red de regulación de la expresión génica implica interacciones específicas entre factores *cis* y *trans* por lo que la correcta conformación del elemento *cis* es un factor limitante para la eficiente interacción con los factores *trans*. Hay diferentes ejemplos que permiten ilustrar cómo una determinada conformación o estructura secundaria juega un papel esencial en el control postranscripcional de la expresión génica. Un ejemplo de la importancia de la conformación tridimensional de elementos *cis* tiene lugar en el mRNA de *Fed-1*. Se ha comprobado *in vitro* que cambios en la secuencia (CAUU)<sub>4</sub> de la 5'UTR del mRNA *Fed-1* afectan a su estructura terciaria y esto aumenta la accesibilidad de esa región a las ribonucleasas. Todo sugiere que cambios en la geometría de las repeticiones aumentan la inestabilidad de los mensajeros (Bhat *et al.*, 2004). En el cloroplasto de espinaca, la unión a la 5'UTR de *psbA* del complejo proteico implicado en la traducción es completamente dependiente de una estructura secundaria específica y cambios estructurales dentro del RNA interfieren en la unión y en la actividad biológica del transcrito. También, en este

caso, la presencia de una horquilla es condición necesaria pero no suficiente para la unión de las proteínas. Requiere la presencia adicional de la secuencia adyacente en simple cadena (Klauff *et al.*, 1997).

Algunos dominios proteicos de reconocimiento del RNA, como los dominios dsRBD, son capaces de interactuar con el RNA a través de distintos radicales de la proteína. Estos dominios pueden interactuar por un lado con grupos 2'OH localizados en el surco menor de una estructura secundaria de RNA y, por otro, reconocer el esqueleto fosfato de la secuencia contigua. Los resultados presentados apoyan la idea de la necesidad de una configuración particular del elemento *cis* de la 5'UTR de *rbcL*, en la cual, parte de la secuencia debe formar parte de una estructura secundaria y la otra parte no. Sólo con la configuración estereoquímica adecuada pueden establecerse los enlaces necesarios para el reconocimiento entre el factor *cis* y el factor *trans*. La implicación de esta conformación puede ser la de facilitar la unión de diferentes proteínas que gobiernen la estabilidad del mRNA protegiendo al transcrito de un ataque ribonucleotídico.

### 3. Importancia de la estabilidad en la regulación de la expresión génica en el cloroplasto.

Este capítulo completa la información previamente descrita sobre el papel que la región 5'UTR ejerce en la estabilidad de los mensajeros. El trabajo define las características conformacionales requeridas en el elemento de estabilidad de la 5'UTR de *rbcL* para que el mRNA en el cloroplasto sea estable. Por un lado, conocer las restricciones estructurales que la molécula de RNA tiene para ser estable es un paso esencial para las aplicaciones biotecnológicas del cloroplasto. Ya se ha comentado la importancia biotecnológica que hoy en día presenta la transformación cloroplástica, con aplicaciones biomédicas y su potencial uso como biofactoría para la producción de proteínas heterólogas. Controlar la expresión de cualquier gen heterólogo en el cloroplasto pasa por el previo conocimiento de los mecanismos de regulación génica y, como ya se ha descrito, en el orgánulo el control de la estabilidad de los mensajeros es un paso crucial. Por otro lado, esta información también resulta esencial para trabajos futuros de identificación y análisis de proteínas implicadas en la estabilidad de

los transcritos cloroplásticos, en especial la del mRNA de *rbcL*. Debe de ser fundamental que se mantenga la conformación espacial del elemento de estabilidad del RNA para que las proteínas que se unen a esta región lo puedan reconocer. Esta puede ser una posible explicación de los resultados dispares entre distintos estudios, en los que se ha investigado la interacción entre proteínas y RNAs. Una pequeña diferencia en la secuencia de un RNA puede afectar a su estructura tridimensional y, por tanto, a la posterior interacción de esta molécula con proteínas específicas.

## CAPÍTULO 3

Rastreo *in vivo* de factores *trans* con capacidad de unión a  
la 5'UTR de *rbcL* en *C. reinhardtii*.

### Introducción.

Los RNAs raramente aparecen solos en la célula y desde que se sintetizan hasta que se degradan están sujetos a continuos procesos que constituyen su metabolismo. Las proteínas de unión a RNA (RBPs) son buenas candidatas para mediar estos procesos formando con el RNA complejos ribonucleoproteicos (RNPs) (Moore, 2005). La exclusiva combinación de proteínas y su posición relativa a lo largo del mensajero dictarán los eventos que tendrán lugar en el mRNA. A través de estos complejos RNPs la célula puede regular con precisión la expresión génica ante condiciones cambiantes. Además de participar en los procesos del metabolismo del RNA que tradicionalmente se han contemplado (procesamiento de mensajeros, editado, traducción...) estudios recientes revelan la importancia del papel de los complejos RNPs en otros eventos celulares, como el transporte de mRNAs o su distribución celular durante el desarrollo o en algunos tipos celulares. Por ejemplo, las RNPs desempeñan un papel fundamental como transportadores y como determinantes citoplasmáticos en neuronas, permitiendo un control local de la síntesis proteica y el transporte de mRNAs a las dendritas (Yoshimura *et al.*, 2006).

#### 1. Dominios proteicos de interacción con el RNA.

Recientes estudios filogenéticos han revelado que muchos de los dominios de las proteínas implicadas en el metabolismo del RNA son ancestrales, probablemente datan del ancestro universal común a todos los reinos, pudiendo reflejar la transición entre las formas de vida basadas en el RNA y las formas de vida basadas en las proteínas (Fedoroff, 2002). La estructura de la proteína que interacciona con el RNA es una característica esencial que determinará su habilidad para discriminar entre distintas secuencias y/o estructuras del RNA (Pérez-Canadillas y Varani, 2001). Por ello, es importante resaltar aquellos dominios proteicos que confieren especificidad a la unión proteína-RNA. Las fuerzas electrostáticas son responsables de la atracción inicial entre las dos moléculas hasta que, una vez alcanzada la orientación y distancias correctas, comienzan a actuar otro tipo de fuerzas químicas, como puentes de hidrógeno, que darán especificidad a la unión y fijarán la interacción (Auweter *et al.*, 2006).

Las proteínas con dominios de unión al RNA (RBD) más antiguos y altamente conservados se relacionan con la traducción y la modificación del RNA. En las proteínas citoplasmáticas que interaccionan con los RNAs codificados nuclearmente existen principalmente tres dominios proteicos de reconocimiento de RNA: los motivos RRM, los dominios con homología K (KH) y los motivos de reconocimiento de doble cadena de RNA (ds)RBD. Estos dos últimos dominios son más raros y están menos caracterizados estructural y funcionalmente (Chen y Varani, 2005).

Los dominios RRM están formados por cuatro estructuras en hoja  $\beta$  y dos hélices  $\alpha$ , aunque algunos contienen una quinta estructura en hoja  $\beta$ . La unión de la proteína al RNA depende de una conformación específica del RNA y parece que su función general en la célula es proporcionar una plataforma estructural que dirige a los distintos factores proteicos implicados en el metabolismo de un RNA específico. Este dominio es estructuralmente homólogo a la proteína ribosomal S6 y evolucionó a partir de ésta (Chen y Varani, 2005). Los dominios (ds)RBD se caracterizan por la ausencia de una conformación específica en la proteína libre pero ésta se ordena parcialmente en el complejo proteína-RNA (Pérez-Canadillas y Varani, 2001). Este dominio proteico para reconocer el RNA *in vitro*, requiere al menos 12-13 pares de bases no interrumpidas por bucles u horquillas internas, aunque *in vivo* los sustratos no forman necesariamente esta estructura (Fedoroff, 2002). También se ha visto que *in vivo* el dominio puede participar en interacciones con otras proteínas. Los dominios dsRBD parecen estar emparentados evolutivamente con la proteína ribosomal S5.

Muchas proteínas que interaccionan con el RNA presentan múltiples copias de estos dominios de interacción y la actividad de unión al RNA está determinada de modo cooperativo. Cada proteína contiene además cortas secuencias, de 8-11 aminoácidos, que unen los distintos dominios de interacción, lo que confiere independencia estructural a cada dominio, a la vez que cada cadena de unión entre dominios forma una corta hélice esencial para la interacción con el RNA. Son ejemplos de estos tipos la proteína TRAP o Pumilio (Chen y Varani, 2005).

También cabe señalar el motivo clásico de dedos de Zn como dominio proteico con afinidad por el RNA. Este dominio, aunque se encuentra

principalmente en proteínas de unión al DNA, también una RNA, además de participar en interacciones proteína-proteína (Chen y Varani, 2005; Brown, 2005). Ejemplos de proteínas con dedos de Zn que se unen al RNA son la proteína TIS11d, que reconoce elementos AREs en determinados transcritos diana, y la proteína TFIIIA, que se une al RNA 5S truncado (Chen y Varani, 2005).

Para los objetivos del presente estudio cabría destacar aquellos dominios proteicos presentes en las proteínas importadas al cloroplasto e implicados en la estabilidad de los transcritos del orgánulo. Estas proteínas suelen presentar unos dominios proteicos definidos por repeticiones de tetratricopéptidos (TPR) o pentatricopéptidos (PPR). Los motivos TPR están presentes en un gran número de proteínas, desde bacterias hasta mamíferos. Aparecen formando repeticiones de 34 aminoácidos en tándem o dispersos en la secuencia proteica y se han encontrado en múltiples copias en diferentes proteínas funcionales. Facilita las interacciones específicas entre proteínas y se asume que son motivos de unión macromolecular, estando implicadas en una gran variedad de procesos biológicos (Blatch y Lassle, 1999). Las proteínas con dominios PPR (35 aminoácidos repetidos), motivo relacionado evolutivamente con el dominio TPR, constituyen una superfamilia génica que en plantas superiores incluye 441 miembros (1-2% de todas las proteínas de *A. thaliana*) (Lurin *et al.*, 2004; Nakamura *et al.*, 2004; Fedoroff, 2002). Estos dominios están presentes en proteínas de todos los organismos salvo en procariotas. Su función precisa no se conoce, aunque se ha sugerido que son proteínas de unión al RNA reguladoras de procesos en el cloroplasto y en la mitocondria, porque la gran mayoría están etiquetadas para ser destinadas a estos orgánulos. Estudios con mutantes de estas proteínas han revelado que están relacionadas con el procesamiento o con la traducción de mensajeros en estos compartimentos (Lurin *et al.*, 2004; Small y Peeters, 2000). El número de repeticiones controla la afinidad y especificidad de la proteína por el RNA (Nakamura *et al.*, 2004; Chen y Varani, 2005). Las diferencias estructurales entre los motivos TPR y PPR podrían justificar su diferente afinidad hacia proteínas o hacia RNA, respectivamente. El motivo TPR está constituido por un par de hélices  $\alpha$  antiparalelas y las repeticiones en tándem de estos motivos parecen formar una superhélice que incluye un surco interior. Los residuos aminoacídicos que se proyectan dentro del surco central varían considerablemente entre proteínas, reflejando la variedad de ligandos

que pueden unir y, probablemente, sea el sitio de unión de las proteínas con las que interacciona. En los motivos PPR el fondo del surco central es lo suficientemente ancho como para contener un RNA de simple cadena y las cargas positivas de la superficie del fondo del surco podrían estabilizar la unión con el esqueleto de fosfatos de la molécula de RNA (Small y Peeters, 2000).

Mediante herramientas bioinformáticas se han identificado en *A. thaliana* unas 196 proteínas con dominios RRM y 26 con dominios KH, muchas más que en otros organismos eucariotas como *D. melanogaster* (117 dominios RRM) o *Caenorhabditis elegans* (100 dominios RRM). Lo mismo ocurre con las proteínas con dominios PPR, que son mucho más abundantes en plantas que en organismos no fotosintéticos (Lurin *et al.*, 2004). A pesar de su gran abundancia tenemos muy poca información sobre cómo funcionan estas proteínas y cuántas de ellas se localizan en el cloroplasto (cpRBPs) (Fedoroff, 2002; Nickelsen, 2003). ¿Por qué hay tantas proteínas con dominios RRM y PPR en plantas? Las particularidades del procesamiento de los RNAs de los orgánulos de plantas (p.e. el editado del RNA) podrían ser la razón por la cual estas familias de proteínas han sufrido una radiación evolutiva en las plantas. Estas proteínas forman un conjunto de adaptadores específicos de secuencia con los que marcar o dirigir los transcritos a los diferentes procesos que en ellos tienen lugar, controlando la expresión génica de manera altamente específica (Small y Peeters, 2000).

## 2. Proteínas de unión al RNA.

En el citoplasma los complejos de RNPs van siendo reemplazados y alterados a lo largo de la vida del mensajero en la célula y para la remodelación de las RNPs resulta esencial la acción de las proteínas DExH/De. Estas proteínas, presentes en todos los organismos y en algunos virus, se agrupan dentro de una misma familia (subdividida en DEAD, DEAH y DExH) debido a la alta homología de sus regiones catalíticas. Consumiendo ATP modifican la estructura secundaria y la conformación del RNA, por lo que se asume que presentan actividad RNA helicasa. Están implicadas en todos los aspectos relacionados con el metabolismo del RNA y actúan como un punto de control esencial para el correcto funcionamiento de la célula (Jankowsky y Bowers, 2006; Linder, 2006).



Algunas enzimas podrían agruparse como una familia proteica por el hecho de actuar enzimáticamente sobre el RNA más que por presentar características estructurales comunes. El dominio catalítico por sí mismo, al unirse al RNA, contribuye significativamente a la especificidad de la enzima por su ligando. Son ejemplos de este tipo las RNasas T1, J y H. La principal cuestión que queda por resolver en este tipo dominios catalíticos es cómo se dicta la especificidad de estas proteínas por sus sustratos (Chen y Varani, 2005).

En el cloroplasto de tabaco y de *A. thaliana* se han encontrado RBPs cloroplásticas (cpRBPs) (5 y 8 respectivamente) con tamaños en torno a los 30 kDa y con homología a RBPs nucleares heterogéneas (hnRBPs). Estas proteínas presentan *in vitro* alta afinidad por secuencias ribohomopoliméricas de Us y Gs y se ha sugerido que son proteínas de unión general a los RNAs cloroplásticos (Nickelsen, 2003). Nakamura y colaboradores encontraron que estas cpRBPs forman complejos RNPs de gran masa molecular que estabilizan los mRNAs libres de ribosomas (Nakamura *et al.*, 2001). Al igual que las hnRNPs, las cpRBPs estarían implicadas en múltiples vías reguladoras y podrían funcionar como plataformas en las cuales tendrían lugar distintos procesos del metabolismo del RNA (procesamiento de los extremos, control de la estabilidad o editado del RNA). Estas funciones las llevarían a cabo interaccionando directamente con el RNA o reclutando otros factores implicados en estos procesos (Krecic y Swanson, 1999). Las proteínas con dominios TPRs o PPRs, junto con las cpRNPs, contribuyen principalmente al metabolismo del RNA en el cloroplasto (Nakamura *et al.*, 2004).

Se han descrito en tabaco otras RBPs implicadas en procesos más específicos. Por ejemplo, para el editado de *psbL* se requiere una proteína de 25 kDa y cpRBP31. Esta última también se necesita para el editado de *ndhB* (Hirose y Sugiura, 2001). Por otro lado, en aguacate se han identificado *in vivo* dos proteínas con homología a proteínas de la familia de pequeñas RBPs de *A. thaliana*, que funcionan como chaperonas de RNA en la replicación del viroide ASBVd dentro del cloroplasto (Daros y Flores, 2002).

### 2.1. RBPs que median la estabilidad de los transcritos.

Como ya se ha descrito, tanto en el cloroplasto como en bacterias, la estabilidad de los mRNAs está dirigida principalmente por elementos localizados

en la región 5'UTR de los mismos que, a través de interacciones con factores *trans*, median *in vivo* su estabilidad (Zerges, 2000). A nivel citoplasmático el control de la estabilidad de los mensajeros es dependiente de la protección de los extremos 5' y 3' de los mRNAs y de interacciones entre proteínas específicas y elementos *cis* localizados, generalmente, en las regiones 3'UTR.

En el cloroplasto, el hecho de que todos los eventos implicados en el metabolismo de los mRNAs tengan lugar en el mismo compartimento celular y que la estabilidad y la traducción de éstos dependan de la misma región hace que estos dos procesos estén estrechamente relacionados. Es posible que la célula coordine estos dos procesos a través de un único complejo RNP, por lo que en ocasiones resulta difícil determinar si una proteína de este complejo está implicada en la estabilidad o en la traducción de un mensajero. Distintos experimentos con mutantes que presentan mensajeros inestables (*psbB*, *psbD* y *petD*) señalan la posibilidad de que la misma proteína mutada codificada en el núcleo también esté implicada en la traducción. Estos estudios resaltan la dificultad de discernir entre la participación de esas proteínas en ambos procesos.

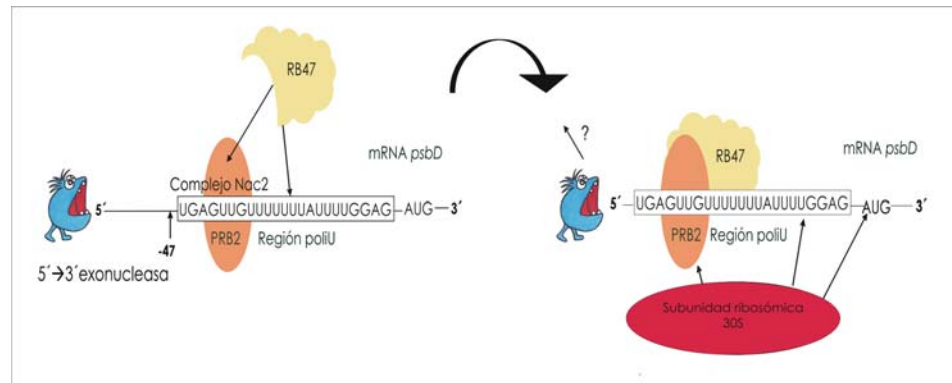
## 2.2. RBPs que interaccionan con la 5'UTR de los transcritos.

Se han identificado distintos factores *trans* que se unen a la región 5' de los mRNAs y afectan a su estabilidad y traducción en el cloroplasto de forma específica (Boudreau *et al.*, 2000; Fisk *et al.*, 1999; Vaistij *et al.*, 2000). Algunas de estas proteínas nucleares ya han sido clonadas (Auchincloss *et al.*, 2002; Dauvillee *et al.*, 2003; Fisk *et al.*, 1999; Somanchi *et al.*, 2005). La mayor parte de los estudios se han llevado a cabo en *C. reinhardtii*, que como ya se ha señalado es organismo modelo para el estudio de la regulación de la expresión génica en cloroplasto. En esta alga, estudios *in vitro* han permitido la identificación de un conjunto de 7 proteínas (de 81, 62, 56, 47 (dos distintas), 38 y 15 kDa respectivamente) que se unen a la región 5'UTR de varios mensajeros cloroplásticos (*psbA*, *atpB*, *rbcL*, *rps7*, *rps12*) (Hauser *et al.*, 1996). Todas estas regiones 5'UTR tienen en común un alto contenido en A+U (70-84%) y estructuras secundarias que pueden ser requeridas para la unión de estas proteínas. Sin embargo, no presentan homología de secuencia entre ellas. El cuadro general que emerge de este trabajo podría ser que existen unas cuantas proteínas de

unión general a todas las regiones 5' UTR de los transcritos cloroplásticos, o a un conjunto de ellos, mientras que otras proteínas darían especificidad de unión a los complejos RNPs concretos (Hauser *et al.*, 1996).

Uno de los estudios más completos sobre la estabilidad de los mensajeros en el cloroplasto de *C. reinhardtii* se ha llevado a cabo con el gen *psbD* (figura 3.1). El mutante *nac2-26* reveló que la estabilidad del mRNA de *psbD* depende de una proteína codificada en el genoma nuclear, NAC2, que forma parte de un complejo de estabilización del mRNA y se une a una región rica en Us de la 5'UTR de *psbD*. Mediante ensayos *in vitro* se demostró que la ausencia de interacción entre NAC2 y una proteína de 47kDa conduce a la inestabilidad del mRNA. La proteína de 47kDa contiene repeticiones de TPRs y sólo cuando interacciona con la región 5' líder de *psbD* es posible la traducción del mensajero. La 5'UTR de *psbD* se procesa en 5', los 74 nucleótidos del precursor se acortan para presentar en el mensajero maduro una UTR de 47 nucleótidos, y antes de este procesamiento se une NAC2 a la región 5'UTR. La forma corta madura está ausente en el mutante *nac2-26* porque el precursor es inestable al ser atacado por las exonucleasas (Boudreau *et al.*, 2000). En el modelo se postula que NAC2 interacciona con el elemento *cis* (llamado PRB2), lo que protege al transcrito del ataque exonucleolítico desde el extremo 5', y posteriormente guía a RBP47 al tramo rico en Us en 3' del sitio PRB2 (Nickelsen *et al.*, 1999). La unión de la proteína RBP47 es dependiente de la unión de NAC2 y, como resultado, conecta el mecanismo de estabilidad con el de traducción. Una vez RBP47 forma parte del complejo NAC2 se suelta del RNA y RBP47 media el ensamblaje del ribosoma, iniciando la traducción del mensajero (Ossenbuhl y Nickelsen, 2000).

En *C. reinhardtii* se requiere la proteína MCD1 para la acumulación específica del mRNA cloroplástico *petD*. Mediante el análisis de mutantes se propone un modelo de protección del mensajero en el cual la unión de MCD1 a la 5'UTR evita su degradación, probablemente por la participación de una exonucleasa. El factor MCD1 no presenta homologías con otras proteínas ni contiene motivos TPR o PPR (Drager *et al.*, 1998; Erickson *et al.*, 2005; Murakami *et al.*, 2005).



**Figura 3.1. Modelo de la expresión del gen *psbD* en el cloroplasto de *C. reinhardtii*.** Según Nickelsen, 2003.

También en esta alga verde la proteína del estroma MBB1 forma parte de un complejo RNP que se une a la región 5'UTR de *psbB* y está implicado en la estabilidad y/o traducción del mismo. Al igual que la proteína NAC2, MBB1 contiene dominios TPR y forma complejos RNPs de gran tamaño molecular (Vaistij *et al.*, 2000). Todas estas proteínas interaccionan con secuencias localizadas en regiones 5'UTR de mensajeros cloroplásticos, aunque queda por determinar si lo hacen directamente o a través de otras proteínas (Boudreau *et al.*, 2000; Vaistij *et al.*, 2000).

En el mRNA cloroplástico de *psbC* se han descrito distintas proteínas de unión a la región 5'UTR que están implicadas en su traducción. Este mRNA presenta la 5'UTR más larga descrita en el cloroplasto de *C. reinhardtii*, con 550 nucleótidos, que es diana para la unión de 3 proteínas citosólicas importadas al cloroplasto, TBC1, TBC2 y TBC3. Esta región presenta una estructura secundaria de 97 nucleótidos requerida para controlar la traducción del transcrito, mediante la implicación de estas 3 proteínas (Zerges *et al.*, 1997; Auchincloss *et al.*, 2002).

El gen *psbA* codifica la proteína D1 del fotosistema II, que es la que mayor recambio proteico sufre en el cloroplasto, por lo que el control de su abundancia debe de estar finamente regulado. Mediante cromatografía de afinidad se identificó un complejo proteico formado por 4 proteínas (RB47, RB60, RB55 y RB38) que presentan afinidad por una secuencia de 36 nucleótidos localizados en una estructura secundaria de la región 5'UTR de *psbA*.

Inmediatamente después de esa secuencia de 36 nucleótidos se localiza la secuencia SD (Danon y Mayfield, 1991). La capacidad de unión de estas proteínas a la región 5'UTR se correlaciona con la tasa de traducción de la proteína D1 *in vivo*, que es máximo en condiciones lumínicas y mínimo en condiciones de oscuridad. Esto sugiere que las proteínas de este complejo son candidatas para ser factores que, codificados en el núcleo, regulan la traducción del mRNA de *psbA* en el cloroplasto de *C. reinhardtii*. La proximidad entre el sitio de unión del ribosoma y el sitio de unión del complejo RNP sugiere que el procesamiento de la región 5' produciría un cambio conformacional que liberaría la secuencia SD, regulando así la traducción. Una alternativa podría implicar que interacciones entre este complejo RNP y las subunidades ribosomales provocaran estos cambios conformacionales (Danon y Mayfield, 1991). Es posible que la unión del complejo proteico al mensajero de *psbA* sea necesaria para el anclaje del transcrito a la membrana del tilacoide, donde tendrá lugar su traducción. Se ha definido una fracción membranosa del tilacoide, denominada LDM (low density membrane), en la cual se ha descrito la formación *de novo* de complejos proteicos de la cadena de transporte fotosintético en cloroplastos en desarrollo (Zerges y Rochaix, 1998). La traducción del mRNA de *psbA* en esta fracción está probablemente regulada por las proteínas previamente descritas (Nickelsen, 2003).

Entre los componentes de este complejo RNP descrito caben destacar:

- La proteína de 47 kDa, que pertenece a la familia de las proteínas eucariotas de unión a la cola poliA (PABP) de los mensajeros. En el cloroplasto se une directamente a la estructura en horquilla de la 5' del mRNA *psbA*. Se postula que esta proteína al ser importada al cloroplasto ha cambiado su función para mediar la interacción, altamente específica, con una región rica en As localizada en la 5'UTR (Fedoroff, 2002).
- La proteína de 60 kDa, que es una disulfuro isomerasa (PDI) y forma parte del complejo RNP a través de su interacción con la proteína de 47 kDa. La PDI es una proteína multifuncional muy conservada, destinada habitualmente al retículo endoplasmático (RE), donde participa en la formación, reducción e isomerización de puentes disulfuro, durante el plegamiento de proteínas. El polipéptido contiene en el extremo C-terminal la secuencia (K/H)DEL de retención en el retículo. Cuando la proteína se importa al cloroplasto de plantas

superiores o de *C. reinhardtii* se localiza tanto en forma soluble en el estroma como fuertemente unida a las membranas tilacoidales a través de parte de su dominio ácido del extremo N-terminal (29-50 aa) (Levitan *et al.*, 2005). Llama la atención que existiendo sólo un gen que codifique esta proteína en el genoma del alga la misma proteína se localice en el RE y en el cloroplasto. La señalización del destino de las proteínas a los distintos compartimentos celulares, tanto para el RE como para el cloroplasto, están localizadas en el extremo N-terminal. Se ha descrito que los primeros 30 aminoácidos localizados en este extremo corresponden al péptido de tránsito al cloroplasto característico de *C. reinhardtii*. Sin embargo, en esta región también debe de localizarse el péptido señal para el RE. No se conoce cómo la célula determina el destino de esta proteína a un compartimento u otro (Kim y Mayfield, 1997; Levitan *et al.*, 2005). Si la proteína es importada al retículo esta señal es cortada tras su traslocación al interior del mismo mientras que si es dirigida al cloroplasto mantiene esta secuencia de señalización.

- La proteína RB38 se ha localizado en el estroma del cloroplasto y contiene 4 repeticiones de 70 aminoácidos con un alto porcentaje de aminoácidos básicos y aromáticos, además de una extensión N-terminal que actúa como secuencia de importación al cloroplasto. Por el dominio de repeticiones, la proteína pertenece a la superfamilia de proteínas de unión a RNA con dominios de homología KH. Esta proteína interacciona con alta especificidad con regiones ricas en pirimidinas dentro de los RNAs diana. En las bases de datos se identifican otras proteínas eucariotas con alta homología de secuencia a ésta pero no se han caracterizado bioquímicamente. Mediante ensayos de competencia *in vitro* se ha determinado que la proteína RB38 disminuye su unión a la 5'UTR de *psbA* cuando se incubaba con extractos totales de RNA de *C. reinhardtii*, indicando que puede unirse a otros mRNAs cloroplásticos, aunque parece que no se une a las 5'UTRs de *rbcl*, *atpA* ni *psbD* (Barnes *et al.*, 2004).

En cuanto al gen *rbcl*, poco hay descrito acerca de las proteínas que se unen a la 5'UTR de su mRNA. En *A. hipochondriacus*, en condiciones lumínicas, se une de forma específica a la región 5' no traducible una proteína de 47 kDa. Esta unión es dependiente del procesamiento del extremo 5', teniendo lugar exclusivamente cuando el transcrito ya está maduro. La función precisa de esta

proteína *in vivo* queda aún por determinar (McCormac *et al.*, 2001). Por otra parte, se ha descrito que en *C. reinhardtii*, en condiciones de estrés oxidativo, se detiene el ensamblaje del holoenzima Rubisco y, como consecuencia, se inicia la degradación de la subunidad pequeña. Se ha demostrado que bajo estas condiciones la subunidad grande de la Rubisco expone su extremo N-terminal y éste presenta homología con motivos de unión a RNA, lo que la capacita para unirse, de manera inespecífica, a cualquier RNA próximo, incluyendo su propio mensajero, y se asume que de este modo bloquea su traducción (Cohen *et al.*, 2005).

### 2.3. RBPs que interaccionan con la 3'UTR de los transcritos.

En eucariotas, en la mayoría de los casos el primer paso para la degradación de los mRNAs es la desadenilación de los transcritos y este proceso puede estar globalmente controlado por cambios en la composición de complejos RNPs. En general, muchas de las proteínas que se unen a secuencias AREs de la región 3'UTR están relacionadas con cambios en la cola poliA (Auweter *et al.*, 2006; Parker y Song, 2004). Otras proteínas implicadas en la degradación de los mensajeros desde 3' son los miembros de la familia de proteínas Puf. Al menos dos de las cinco proteínas Puf en levadura, Puf3 y Puf5, pueden inducir la desadenilación de los transcritos nucleares reconociendo secuencias específicas en esta región (Olivas y Parker, 2000; Tadauchi *et al.*, 2001). Dentro de los factores *trans* implicados en la estabilidad general de los mensajeros citosólicos de plantas que desarrollan su función a través de la región 3'UTR cabe destacar las PABPs. A diferencia de otros eucariotas superiores, existen distintos genes homólogos que codifican estas proteínas y cada una de ellas está regulada de forma distinta, estando implicadas en distintos procesos fisiológicos (Abler y Green, 1996). Otro ejemplo de proteínas de unión a la 3'UTR en plantas superiores, podría ser la proteína PRP-BP que reconoce y se une al elemento *cis* de la 3'UTR del mRNA *PvPRP1*. Esta unión desencadena la desestabilización de dicho transcrito y su capacidad de unión al mRNA está aparentemente regulada por el estado redox de la proteína (Zhang y Mehdy, 1994).

En el cloroplasto, la característica general de las regiones 3' no traducibles de los mRNAs es la presencia de regiones invertidas que forman estructuras en

horquilla. Estas secuencias, más que actuar como señales de terminación de la transcripción, como ocurre en procariotas, parecen estabilizar la secuencia de RNA *in vitro* (Stern y Grussem, 1987; Adams y Stern, 1990) e *in vivo* (Stern *et al.*, 1991; Stern y Kindle, 1993) y se relacionan con el procesamiento del extremo 3' de la molécula. Esta región es esencial para que el transcrito quede correctamente procesado en ese extremo y la presencia de un extremo 3' correctamente formado es requisito imprescindible para que el transcrito final sea estable, aunque en ella no residen elementos que controlen su vida media. Las proteínas descritas de unión a la 3'UTR están implicadas en el procesamiento del extremo 3' y en su degradación influyendo, por ello, en su vida media. En plantas superiores, se han descrito un par de proteínas de unión a la región 3'UTR de *psbA*, cuya función exacta no se conoce (Memon *et al.*, 1996) y distintas proteínas o complejos proteicos con actividad endo y/o exonucleasa implicadas en el procesamiento y formación del extremo 3' (Boudreau *et al.*, 2000; Nickelsen y Link, 1993; Walter *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 1996).

En *C. reinhardtii* hay pocas proteínas descritas, tanto en el citoplasma como en el cloroplasto, con unión a la región 3'UTR de los mensajeros e implicadas de algún modo en la vida media de los mismos. La proteína citoplasmática CHLAMY1, implicada en el control circadiano de la expresión génica, interacciona de forma específica con la región 3'UTR de distintos mensajeros y participa en su traducción. Todos los transcritos con los que interacciona están implicados en el metabolismo del nitrógeno y el CO<sub>2</sub> y contienen un elemento *cis* común compuesto por al menos 7 repeticiones de U+G (Mittag, 2003). En el cloroplasto de esta alga, la proteína CRP3 parece participar tanto en el procesamiento como en la estabilización de *atpB* a través de su interacción con la región 3'UTR de este mensajero. Se postula que esta proteína es parte de la maquinaria general de procesamiento 3'→5' (Levy *et al.*, 1999).

### **3. Regulación de la interacción entre factores proteicos *trans* y los elementos *cis* de los transcritos.**

Existen diferentes mecanismos mediante los cuales se puede controlar la interacción entre proteínas y mensajeros. Se puede actuar sobre la accesibilidad del RNA y la proteína implicada en la regulación de su



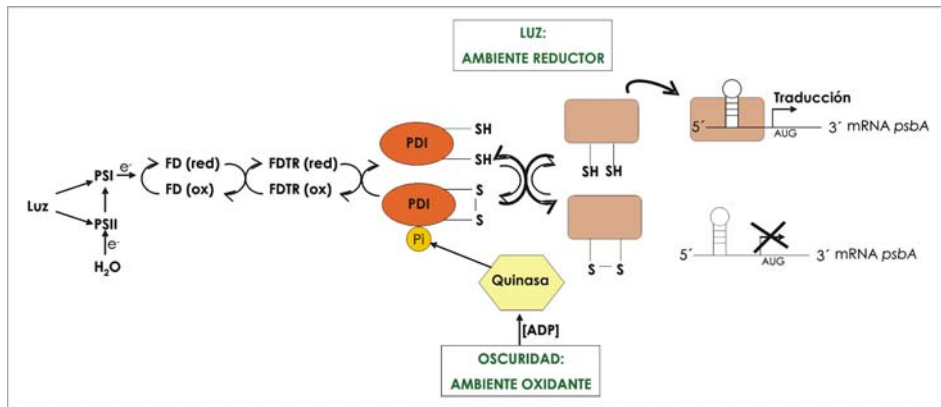
metabolismo. Por ejemplo, las proteínas de unión a secuencia AREs, HuR y AUF, pueden unirse indistintamente al mismo mRNA en el núcleo, porque el sitio de unión de cada una de ellas es distinto, no se superponen y son accesibles a las distintas proteínas. A pesar de ello, cada una de estas proteínas se asocia con poblaciones específicas de mensajeros en el citoplasma. En algunos tipos celulares, como las neuronas, este modo de regulación es esencial (Barreau *et al.*, 2005). Otro modo de regulación sería secuestrando el mensajero. En mamíferos, algunas proteínas de unión a secuencias AREs actúan como marcadores de tráfico molecular, capturan un mensajero en gránulos de estrés y lo retienen mientras existan condiciones celulares adversas. Una vez ha pasado el estrés se decide si éste pasa a la vía de degradación en gránulos P o a la vía de traducción en los polisomas (Anderson y Kedersha, 2006). Los datos parecen sugerir que los transcritos regulan su degradación mediante proteínas o complejos multiproteicos específicos que se unen a elementos de secuencia del RNA, evitando así su degradación.

En el cloroplasto, procesos como la fosforilación o cambios redox en respuesta a estímulos, como la luz o el desarrollo, promueven la asociación y disociación entre mRNAs y cpRNPs, lo que controla, en último término, procesos como la traducción y la estabilidad de los mensajeros (Danon y Mayfield, 1994; Kim y Mayfield, 1997).

Estudios previos en *C. reinhardtii* han puesto de manifiesto que la señal que controla la estabilidad del transcrito de *rbcl* en el cloroplasto es una señal redox originada en la cadena fotosintética. Mediante el uso de agentes bloqueantes de la cadena de transporte fotosintético (DCMU) o agentes reductores (DTT) se consigue alterar la vida media del mRNA de *rbcl*, lo que sugiere que el sistema ferredoxina-tiorredoxina podría estar implicado en la transducción de la señal redox, originada en la cadena de transporte fotosintética, y que modularía la estabilidad del mRNA de *rbcl* en el cloroplasto de *C. reinhardtii* (Salvador y Klein, 1999). El proceso podría estar regulado a través de la unión al mRNA de una proteína en su estado oxidado; cuando esta proteína se reduzca perderá su capacidad de unión a RNA. Así, modulando la unión específica de esta proteína al RNA se regulará el proceso de estabilidad del mRNA de *rbcl*. También se ha descrito la existencia de un control redox de la traducción del

gen *rbcl*, en condiciones de estrés oxidativo, mediado, en este caso, por glutatión (Irihimovitch y Shapira, 2000).

El ejemplo mejor caracterizado en *C. reinhardtii* de regulación de la expresión génica en el cloroplasto, llevada a cabo por un complejo proteico de unión a la 5'UTR, es el control de la traducción del mRNA de *psbA*. La unión de este complejo puede regularse, al menos *in vitro*, por dos mecanismos distintos: mediante cambios redox y mediante fosforilación dependiente de ADP (Danon y Mayfield, 1994). Ya se han detallado las proteínas que forman parte de este complejo y entre ellas se encuentra la PDI. Su función parece ser la de modular la unión de RB47 al RNA, cambiando el estado de oxidación-reducción de RB47, vía formación-ruptura de enlaces disulfuro. El potencial reductor empleado por la PDI procede de las reacciones luminosas de la fotosíntesis (Barnes *et al.*, 2004). La reducción de RB47 en la luz aumenta su afinidad por la 5'UTR de *psbA*. El complejo de proteínas no se une a la región 5'UTR cuando se encuentra oxidado y se puede revertir este estado si se trata el complejo con agentes reductores (DTT) (Kim y Mayfield, 1997; Alergand *et al.*, 2006). Se ha comprobado que las proteínas RB47 y PDI interaccionan entre sí mediante un puente disulfuro (Alergand *et al.*, 2006). La unión de este complejo dirige la traducción del mRNA. Esta regulación redox de la formación del complejo en la 5'UTR de *psbA* también se ha descrito en *A. thaliana* (Shen *et al.*, 2001). La fosforilación de la PDI en el complejo proteico tiene lugar en respuesta a un aumento de la concentración de ADP en el estroma, cuando las células pasan a oscuridad (Mayfield *et al.*, 1994; Danon y Mayfield, 1994). Sólo en estado desfosforilado la PDI es activa y se puede unir a RB47, la reduce y estimula la traducción del mRNA.



**Figuras 3.2. Modelo de regulación por la luz de la traducción del mRNA de *psbA* en *C. reinhardtii*.** Según Kim y Mayfield, 1997. Las flechas delgadas y gruesas representan respectivamente los acontecimientos en luz y en oscuridad. PS, fotosistemas; FD, ferredoxina; FDTR, ferredoxina-tiorredoxina reductasa; PDI, proteína disulfuro isomerasa; ox, oxidado; red, reducido; Pi, grupo fosfato inorgánico.

En general, los datos indican que los complejos proteicos de gran tamaño molecular unidos a los mRNAs representan las unidades básicas de control y regulación del metabolismo de la célula y, en este caso, controlan la expresión génica en el cloroplasto.

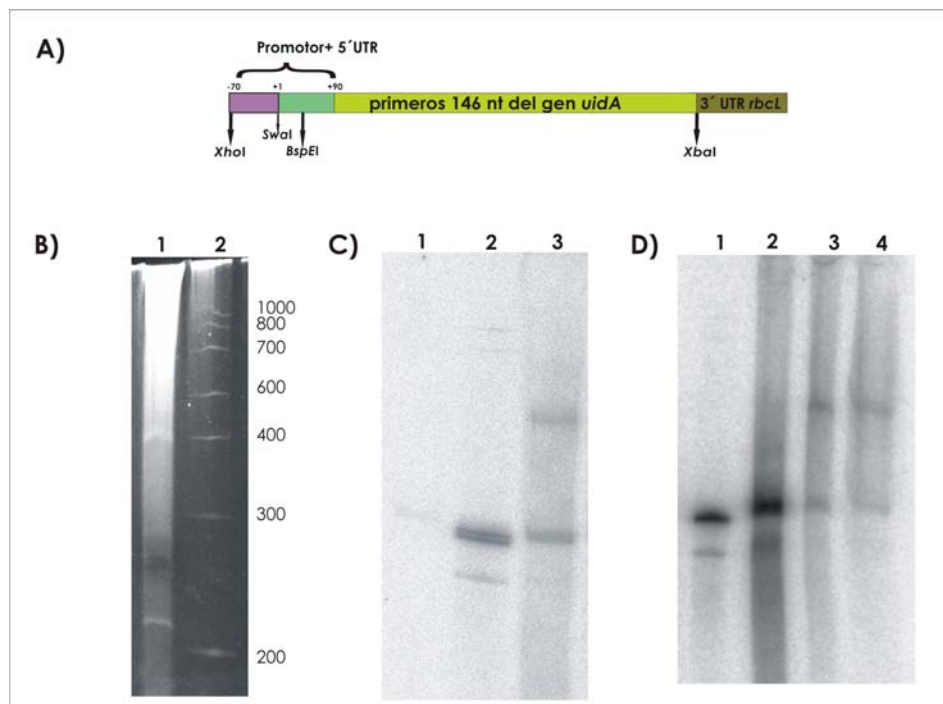
## Resultados.

### 1. Unión in vivo de proteínas a la 5'UTR de *rbcl*.

Con objeto de identificar las proteínas de unión a la 5'UTR de *rbcl* que al interactuar con el factor *cis* de esta región controlan la estabilidad de este transcrito, se planteó una aproximación bioquímica de búsqueda global de proteínas de unión a esta región del RNA *in vivo*.

Tanto el mensajero endógeno de *rbcl* como los transcritos quiméricos estudiados, portadores de la región 5'UTR del mismo gen, presentan una mayor estabilidad en condiciones de oscuridad. Por ello, la hipótesis de partida supone un modelo de regulación de la estabilidad del transcrito basado en la interacción de algún factor o complejo *trans* que, en oscuridad, reconoce la región reguladora del mensajero y lo protege de la degradación. El cambio de oscuridad a luz inducirá que este factor proteico se suelte de la 5'UTR haciendo que los transcritos presenten una mayor vulnerabilidad al ataque por ribonucleasas. Por tanto, la proteína que media la estabilidad del mensajero estará unida a él en estas condiciones de oscuridad. Con objeto de "congelar" las proteínas unidas al RNA *in vivo* se irradiaron células de *C. reinhardtii* con luz ultravioleta. Las células crecidas con fotoperíodo de 12 horas luz - 12 horas oscuridad se recogieron, para irradiarlas, tras 11 horas de oscuridad. La acción de este entrecruzador forma enlaces covalentes únicamente entre radicales que están en contacto, por lo que fija interacciones directas entre el RNA y las proteínas que en ese momento del ciclo celular estén unidas al RNA *in vivo*. Para visualizar la interacción con la 5'UTR de *rbcl* el experimento requiere la utilización de un transformante de *C. reinhardtii* que exprese el gen quimérico con un tamaño que permita observar la diferencia de movilidad electroforética entre el RNA quimérico libre y el aducto RNA-proteína. Con esta finalidad se creó un nuevo transformante, denominado GUS146 [5'UTR de *rbcl*: los 146 primeros nucleótidos de la región codificante del gen *uidA*: 3'UTR de *rbcl*], cuya longitud final está en torno a los 350 nucleótidos, tras el procesamiento del extremo 3' en la célula (figura 3.3.A). La unión específica de proteínas a la región 5'UTR se puso de manifiesto observando, mediante Northern blot, la menor movilidad de los complejos RNA-proteínas comparada con el mismo RNA

transgénico no unido a los factores proteicos, en un gel PAGE desnaturalizante (figura 3.3.C).



**Figura 3.3. Unión *in vivo* de proteínas a la 5'UTR del mRNA de *rbcL*.** **A)** Esquema de la construcción GUS146 para el ensayo de retardo en gel. **B)** Gel PAGE desnaturalizante teñido con Bromuro de etidio. 1, muestra entrecruzada; 2, marcador de tamaños moleculares de RNA. **C)** Análisis por Northern blot de extractos de *C. reinhardtii* irradiados con luz UV y separados por PAGE desnaturalizante. La sonda empleada es un RNA antisentido de los primeros 146 nucleótidos del gen uidA. 1, control negativo de células silvestres irradiadas; 2, control de RNA total de transformantes de *C. reinhardtii* con el transgen GUS146; 3, muestra de células transgénicas GUS146 irradiadas con 318 mJ/cm<sup>2</sup> de luz UV de 254 nm. **D)** Digestión con proteinasa K. 1, control de RNA total de *C. reinhardtii* GUS146; 2, muestra irradiada incubada con proteinasa K; 3, control negativo de la digestión con proteinasa K incubando con el mismo tampón pero sin proteinasa K; 4 muestra de células irradiadas y no tratadas como control positivo de la formación de aductos RNA-proteínas.

Este tipo de experimento se basa, en primer lugar, en una extracción de ácidos nucleicos en la cual se precipitan de forma no selectiva todos los aductos de ácidos nucleicos-proteínas y, posteriormente, se enriquece la muestra de aductos de RNA. De este modo, en la misma carrera del gel de electroforesis, se separan por tamaños todos los aductos RNA-proteínas, por lo

que se utiliza una sonda específica para visualizar el aducto correspondiente al RNA quimérico. Aunque aquí no se muestren los resultados de la puesta a punto de esta técnica en *C. reinhardtii* se determinó el tiempo adecuado de irradiación de las células con luz UV para poder visualizar los aductos específicos formados. Se realizaron irradiaciones de distintas muestras durante 0, 5, 15 y 30 minutos, comprobándose que la banda de retardo adquiría mayor intensidad al aumentar el tiempo de irradiación. Se fijó el tiempo de exposición de las células a la luz en 15 minutos y se comprobó que en las células no irradiadas no aparece retardo. En la figura 3.3.C se observa el resultado del Northern blot. En la carrera 2 se inyectaron 6 µg de RNA procedente de una extracción de RNA total de células transgénicas de *C. reinhardtii*. Esta carrera refleja la movilidad del RNA quimérico en este tipo de gel (figura 3.3.B). En la carrera 3 se inyectó la muestra obtenida de células irradiadas con luz UV. En la muestra se aprecian dos bandas: una con la misma movilidad que la banda de RNA libre y una banda superior que corresponde a un RNA de mayor masa molecular. Este aumento de la masa molecular del RNA específico se debe a la interacción de forma covalente de alguna molécula con el RNA quimérico. La carrera 1 corresponde al control negativo de la formación de aductos quiméricos. Esta muestra procede de células silvestres, no transgénicas, que fueron irradiadas y tratadas de igual modo que las del transformante GUS146, por lo que presentarán los mismos aductos que la muestra problema menos el del RNA quimérico GUS146. Como era de esperar, no se observa la aparición de ninguna banda marcada.

Para comprobar si este aumento de la masa molecular se debe a la unión de proteínas al RNA o a la formación de complejos entre ácidos nucleicos o a algún tipo de artefacto debido a la irradiación con UV, se llevó a cabo una digestión con proteinasa K de los aductos obtenidos (figura 3.3.D). Las carreras 1 y 4 representan los controles. La carrera 1 contiene RNA total obtenido de células silvestres. En la carrera 4 se cargó la muestra irradiada con luz UV como control positivo. En el pocillo 2 de la electroforesis se separó la muestra irradiada incubada con proteinasa K y en el 3 la muestra incubada de igual manera pero sin la proteinasa, siendo así un control negativo de la incubación. Con objeto de minimizar la variabilidad de resultados entre muestras en las carreras 2, 3 y 4 se utilizaron células irradiadas en el mismo experimento. La carrera 3 presenta la

misma distribución de bandas y de intensidad de marca radiactiva que la carrera 4, descartando que durante el proceso de incubación se produjese la degradación de las proteínas por otras causas, evitando así posibles falsos positivos. En la carrera 2 se observa que, tras eliminar las proteínas de estos complejos, desaparece la banda de mayor tamaño y aumenta la intensidad de la correspondiente al RNA libre, señalando la naturaleza proteica de los aductos obtenidos.

## **2. Análisis de las proteínas de los aductos RNA GUS146-proteína mediante espectrometría de MS/MS.**

Se procedió al análisis de las proteínas asociadas al RNA en la banda electroforética identificada (figura 3.3.C) por espectrometría de masas. El procedimiento de selección de las proteínas unidas a GUS146 utilizado en este rastreo no permite la purificación exclusiva del transcrito, ya que en la extracción se copurifican otros complejos RNA-proteínas que pueden presentar la misma movilidad electroforética que el transcrito de estudio GUS146. Para conocer el fondo proteico presente en la muestra y no debido a las proteínas unidas al RNA de GUS146 se llevó a cabo el experimento en paralelo con una muestra control procedente de células silvestres irradiadas y se secuenció la misma banda de ambas muestras. La secuenciación de la muestra control determinará el fondo proteico de la muestra del transformante con el transgen.

A las proteínas identificadas por MS/MS en la muestra secuenciada del transformante GUS146 se restaron todas las proteínas identificadas en la muestra control y todas aquellas proteínas que, claramente, parecen contaminaciones de la muestra por el proceso de manipulación, como tripsina y queratinas. Las proteínas identificadas de forma inequívoca con una probabilidad del 99,95% según el algoritmo MASCOT se reflejan en la tabla 3.1. Cabe destacar que se identifican claramente distintas proteínas de *C. reinhardtii*.

De entre todas las proteínas identificadas en la banda de retardo hay algunas cuya presencia se podría explicar por su gran abundancia en la célula o por la mala separación electroforética que presentan las proteínas en este tipo de geles.

NOMBRE Y FUNCIÓN.	ORGANISMO	ÍNDICE	FRAGMENTOS	PORCENTAJE COBERTURA
Disulfuro isomerasa (PDI). Formación puentes disulfuro. gi   4104541	<i>C. reinhardtii</i>	732	16	43.23%
Proteína ribosómica S5. gi   30840952	<i>C. reinhardtii</i>	336	5	9.9%
Proteína 14-3-3. Unión entre proteínas. gi   32400185	<i>C. reinhardtii</i>	264	5	24.7%
Proteína OEE1. PSII. gi   18160	<i>C. reinhardtii</i>	207	4	14.7%
Proteína de unión al RNA RB38. gi   37545634	<i>C. reinhardtii</i>	186	3	9.1%
Tubulina $\beta$ 1. Citoesqueleto. gi   22003	<i>Volvox carteri</i>	164	3	6.9%
Proteína quinasa. Fertilización. Dominio CBS. gi   7484401	<i>C. reinhardtii</i>	151	3	10.78%
Proteína L2 ribosómica. gi   24496509	<i>C. reinhardtii</i>	143	3	12.58%
Subunidad grande de la Rubisco. Fijación del CO <sub>2</sub> . gi   68155	<i>C. moewusii</i>	118	2	2.3%
Factor de elongación de la traducción. gi   31747338	<i>Hevea brasiliensis</i>	116	3	26%
Proteína At5g15200. Proteína ribosomal S4. gi   38566648	<i>A. thaliana</i>	111	2	12.6%
Precursor de la fosfoglicerato quinasa. gi   7434543	<i>C. reinhardtii</i>	95	2	5.6%
Proteína 14-3-3. Proteína adaptadora. gi   9795170	<i>C. reinhardtii</i>	93	2	7.3%
APOC. Aposporina. Relacionada con apomixis. gi   6970044	<i>C. reinhardtii</i>	87	2	6.5%
Sedoheptulosa bifosfatasa. gi   515618	<i>C. reinhardtii</i>	84	2	6.1%
Proteína de choque térmico 70B. gi   1225970	<i>C. reinhardtii</i>	75	1	2%
Proteína ribosómica 60S HS-5. gi   6440928	<i>Chlamydomonas</i> sp.	66	1	4.2%
Proteína hipotética. Función desconocida. gi   23484844	<i>Plasmodium yoelii yoelii</i>	64	1	1.6%
P21 precursor. PS I. gi   18184	<i>C. reinhardtii</i>	63	1	6.6%
Proteína hipotética glr3844. Posible proteína. Dominio TPR. gi   37523413	<i>Gloeobacter violaceus</i>	58	1	5.1%
Adenosilhomocisteinasa. gi   84087	<i>Dictyostelium discoideum</i>	58	1	2%
Proteína hipotética CNBC6450. Función desconocida. gi   50258927	<i>Cryptococcus neoformans</i>	58	1	2%
Proteína D2. PSII. gi   225115	<i>C. reinhardtii</i>	56	1	2.75%
$\beta$ - glucanasa. Cataboliza glucano. gi   22550395	<i>Vitis vinifera</i>	55	1	1.9%
Proteína ribosomal S8. gi   3264759	<i>Prunus armeniaca</i>	54	1	6.8%



NOMBRE Y FUNCIÓN.	ORGANISMO	ÍNDICE	FRAGMENTOS	PORCENTAJE COBERTURA
Proteína similar a proteína de estrés por frío. gi   50875975	<i>Desulfotalea psychrophila</i>	52	1	5.7%
Proteína CG11448-PA. Proteína autofágica Ap6. gi   18543225	<i>Drosophila melanogaster</i>	52	1	2%
Proteína1 de membrana de eritrocito. Unión a la placenta humana. gi   15991381	<i>P. falciparum</i>	51	1	0.5%
Proteína tipo FKBP. Isomerasa. gi   6686802	<i>A. thaliana</i>	50	1	1.7%
Proteína hipotética. Proteína de función desconocida. gi   3618277	<i>Sphingomonas sp.</i>	49	1	2.2%

**Tabla 3.1. Proteínas identificadas en el análisis MS/MS de la muestra GUS146.** En la tabla se describe de cada proteína identificada el nombre y función de la misma, número de acceso a las bases de datos de proteínas, el organismo del cual se ha identificado mediante la información tríplica de las bases de datos, el número de péptidos únicos que han sido identificados, el porcentaje de cobertura de la proteína en secuencia y el índice\* MASCOT de identificación. Cada proteína identificada presenta un índice de probabilidad mayor de 49 que asegura que la aparición de un péptido no es un suceso aleatorio y que es homólogo al péptido de la proteína identificada en las bases de datos con una confianza del 99,95%.

Entre las proteínas identificadas hemos descartado, inicialmente, aquellas que por su función no parecen estar implicadas en la regulación de la estabilidad de los mRNAs. Las **proteínas ribosomales** (5), además de ser muy abundantes, pueden aparecer unidas a otros transcritos que se traduzcan y presenten la misma movilidad en este tipo de gel desnaturizante. El mensajero de estudio presenta todas aquellas secuencias necesarias para ser traducido como un transcrito endógeno, por lo que su presencia en la banda del retardo también podría deberse a la traducción del transcrito quimérico. Aunque es coherente la identificación de un factor de la elongación de la traducción interaccionando con el transcrito heterólogo no parece que, de manera inicial, sea una proteína de interés para el estudio, ya que debe de ser una proteína de unión general a todos los mensajeros traducibles.

En principio, por su función, parece evidente que podemos descartar las proteínas del **citoesqueleto** (1) y de los **complejos fotosintéticos** (3) identificadas en el análisis

Las proteínas solubles secuenciadas implicadas en el **metabolismo** (4) y en la respuesta al estrés por **choque térmico** (2) tampoco parecen ser buenas

candidatas para tener un papel específico en el control de la estabilidad del mensajero de *rbcl*. También podemos descartar una proteína quinasa de 48 kDa y la proteína APOC, ambas relacionadas con la **reproducción**, sexual en el primer caso y asexual en el segundo. Asimismo, aparecen 3 proteínas de otras especies (*Plasmodium falciparum*, *Drosophila melanogaster* y *A. thaliana*) que, por su función, no parecen estar relacionadas con la 5'UTR del transcrito GUS146 y, claramente, deben de ser contaminaciones de la muestra en algún momento del proceso. Además, es frecuente que la proteína de *P. falciparum* aparezca como contaminante en los análisis de MS/MS (comunicación personal del servicio de proteómica). También aparecen identificadas 4 hipotéticas proteínas, de función desconocida, de distintas especies (*P. yoelii yoelii*, *G. violaceus*, *C. neoformans*, *Sphingomonas* sp.).

Puesto que la proteína específica que regula la interacción con la 5'UTR de *rbcl* es una proteína que, hasta el momento, no ha sido descrita y, por tanto, no aparece en las bases de datos de proteínas, nuestro objetivo es identificarla a través de otras proteínas que formen parte del mismo complejo RNP. De entre todas las proteínas identificadas en la secuenciación por MS/MS se han seleccionado aquellas cuya función o características descritas las hacen posibles candidatas para formar parte de este complejo RNP que podría estar implicado de algún modo en la estabilidad de los transcritos (tabla 3.2).

NOMBRE	FUNCIÓN	ÍNDICE TOTAL	Nº PÉPTIDOS
Disulfuro isomerasa, <b>PDI</b> . gi   4104541	Formación puentes disulfuro.	732	16
Proteínas <b>14-3-3</b> . gi   32400185 y gi   9795170	Media interacciones entre proteínas participando en diversos procesos	264 + 93	5 + 2
Proteína de unión al RNA, <b>RB38</b> .	Reconocimiento de RNA.	186	3
Subunidad grande de la Rubisco.	Fijación del CO <sub>2</sub>	118	2
Proteína hipotética <b>glr3844</b> .	Posible proteína. Dominio TPR.	58	1

**Tabla 3.2. Proteínas seleccionadas por su posible papel en el complejo con la 5'UTR de *rbcl*.** En la tabla se describe para cada proteína su nombre y número de acceso a las bases de datos proteicas, su función, el índice MASCOT (identifica una proteína con un p-valor > 0.05 si este índice es mayor o igual a 49) y el número de péptidos identificados con un índice MASCOT con una confianza estadística del 99.5%.

La PDI puede ser una proteína muy importante para este estudio. Primero, porque es capaz de acoplar cambios de oxidación-reducción del medio a otras

proteínas y la estabilidad del transcrito de estudio presenta este tipo de regulación. Segundo, porque se ha identificado formando parte de un complejo RNP con capacidad de unión a la 5'UTR de *psbA* en el cloroplasto de *C. reinhardtii*, mediando también la regulación redox del proceso en el que participa. Lo más interesante es que en el complejo RNP de unión a la 5'UTR de *psbA* existe una relación bien establecida entre la PDI y la proteína RB38 y esta última también se ha identificado en nuestro análisis como parte del complejo RNP de unión a la 5'UTR de *rbcl*.

Las proteínas 14-3-3 en *C. reinhardtii* constituyen una familia de 4 proteínas (32, 30, 27 y 24 kDa) con distintas localizaciones subcelulares, que parecen estar implicadas en mediar interacciones entre proteínas, siendo elementos reguladores de señalización intracelular (Voigt *et al.*, 2001). Por este motivo podría formar parte del complejo regulador de la estabilidad del mensajero de *rbcl*.

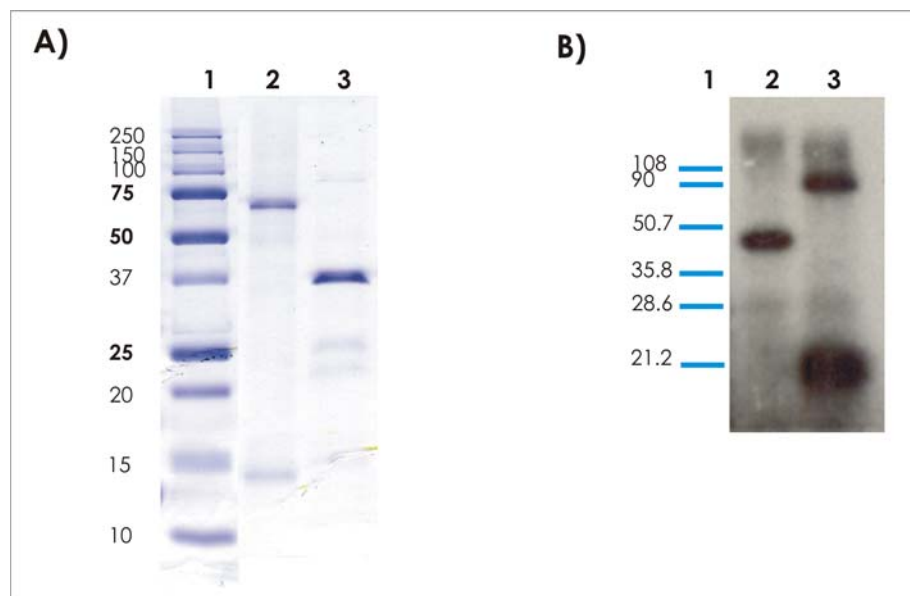
También se puede resaltar la subunidad grande de la Rubisco. Se ha descrito la capacidad para unirse a su propio mensajero, así como a cualquier otro, en condiciones de estrés fotooxidativo, deteniendo así la traducción del mismo (Cohen *et al.*, 2005). La capacidad de unión al RNA parece ser consecuencia de la proteólisis de la enzima en condiciones de estrés.

La hipotética proteína glr3844 de *G. violaceus* resulta de especial interés por distintos motivos. En primer lugar, *G. violaceus* es una cianobacteria, por lo que está relacionada filogenéticamente con el ancestro del cloroplasto. En segundo lugar, aunque no se conoce la función de la proteína glr3844 en *G. violaceus*, ni siquiera por presentar homología con otras proteínas, ésta presenta dominios TPR. Estos dominios están descritos en proteínas de complejos RNP implicados en la estabilidad de mensajeros cloroplásticos.

### 3. Comprobación *in vitro* de la unión de las proteínas PDI y RB38 a la 5'UTR de *rbcl*.

El estudio se ha iniciado con las proteínas PDI y RB38 de *C. reinhardtii* de las que se disponen sus secuencias codificantes clonadas. Se pretende comprobar si estas dos proteínas identificadas formando parte del aducto RNA-proteínas obtenido *in vivo* son capaces de interaccionar con la 5'UTR de *rbcl* y asegurar

que su identificación no se debe a su interacción con otras partes del transcrito quimérico.



**Figura 3.4. Interacción de las proteínas RB38 y PDI con la 5'UTR de *rbcL*.** **A)** Separación de las proteínas expresadas *in vitro* con cola de histidina en un gel SDS-PAGE al 15%. **1**, marcador de pesos moleculares, kDa; **2**, proteína PDI; **3**, proteína RB38. **B)** Ensayo de interacción *in vitro* y tratamiento con RNasa E previo a la cromatografía SDS-PAGE al 10%. **1**, marcador de pesos moleculares; **2**, Ensayo con la proteína RB38, **3**, Ensayo con la proteína PDI.

Ambas proteínas, PDI y RB38, se expresaron con una cola de histidinas y, en la figura 3.4.A, se puede estimar la masa molecular de cada una de ellas. Para confirmar la existencia de una interacción directa entre estas proteínas con la 5'UTR del gen *rbcL* se incubó *in vitro* cada proteína con la región 5'UTR de *rbcL* marcada con  $^{32}\text{P}$ . Tras fijar esta interacción con luz ultravioleta se degradó el RNA con RNasa E. Las proteínas se visualizaron en un gel SDS-PAGE tras ser expuesto a una autorradiografía (figura 3.4.B). Sólo si existe una interacción directa entre la proteína y el RNA se podrán observar las proteínas en la autorradiografía, ya que habrán quedado marcadas radiactivamente por el fragmento de RNA que queda protegido de las RNAsas por su interacción con las proteínas. En la carrera 3 se analizó el resultado de la interacción de la proteína PDI con el RNA marcado, observándose una banda entre 35.5 y 50.7

kDa. Este incremento del tamaño molecular de la proteína se debe al fragmento de RNA unido a la misma, que queda protegido de la degradación por la RNasa E. En la carrera 2 se analizó el resultado de la interacción de la proteína RB38 con el RNA marcado y también se observa la banda correspondiente a la proteína marcada radiactivamente, que como en el caso anterior, presenta un tamaño molecular superior al de la proteína libre. En esta carrera podemos observar una segunda banda más difusa, de menos de 21.2 kDa.

Los resultados indican que, *in vitro*, estas dos proteínas se unen a la región 5'UTR de *rbcl*. Su identificación *in vivo* formando parte de un complejo RNP se debe, al menos en parte, a su interacción con la región 5'UTR de *rbcl* y no exclusivamente con otras partes del transcrito quimérico. Podemos señalar que parece que la PDI puede unirse directamente a esta región del RNA, sin necesidad de interaccionar a través de RB38 o de otra proteína, como se ha descrito en la literatura.

## Discusión.

### 1. Estudios previos relacionados con los resultados obtenidos.

Mediante ensayos de interacción *in vitro* se ha analizado la afinidad de proteínas de *C. reinhardtii* por regiones 5'UTR de distintos mRNAs cloroplásticos. Las proteínas procedían de extractos proteicos totales de células crecidas en distintas condiciones. Entre las diferentes 5'UTR analizadas *in vitro* se encuentra la de *rbcl* y se determinó la unión a ésta de 4 proteínas distintas (de pesos moleculares 80 kDa, 56 kDa, 38kDa y 15 kDa). La intensidad de la banda de cada proteína varía según las condiciones de crecimiento de las células. En condiciones de fotoautotrofia se observan las 4 proteínas (Hauser *et al.*, 1996). En nuestro estudio las células fueron crecidas en condiciones fotoautotróficas identificando *in vivo*, entre otras, dos proteínas, PDI y RB38. Éstas podrían ser las proteínas de 56 kDa y de 38 kDa que en el trabajo de Hauser *et al.* se unen *in vitro* a la región líder de *rbcl*. Además, entre las regiones 5'UTR estudiadas también se encuentra la 5'UTR de *psbA*, observándose el mismo patrón de proteínas de unión a estas dos 5'UTR (Hauser *et al.*, 1996). Como se ha documentado anteriormente estas dos proteínas, RB38 y PDI, se unen a la región 5'UTR de *psbA* y regulan su traducción. La proteína RB38, unida a *psbA*, parece presentar afinidad por la región rica en Us cercana al sitio de unión del ribosoma (Barnes *et al.*, 2004; Mayfield *et al.*, 1994). La región 5' no traducible de *rbcl* también presenta un alto contenido en Us, por lo que esta proteína también podría establecer interacciones con la región 5' del transcrito de *rbcl*. Entre los factores con capacidad de unión a los mRNAs de los orgánulos, podríamos distinguir tres clases: factores generales que se unen a todos los mRNAs, factores específicos que se unen a genes relacionados funcionalmente (p.e. genes fotosintéticos) y factores específicos que se unen de manera exclusiva a mRNAs concretos (Gillham *et al.*, 1994). Las proteínas identificadas en este análisis *in vivo* podrían pertenecer al segundo grupo de proteínas ya que el modelo de regulación de la traducción de *psbA*, a través de la PDI, se ha propuesto que podría operar también regulando la expresión génica de otros mensajeros en el cloroplasto (Kim y Mayfield, 1997). Por lo tanto, todo apunta a que estas proteínas podrían formar parte de un complejo proteico general implicado en la

regulación de la estabilidad y/o traducción de distintos mRNAs cloroplásticos funcionalmente relacionados. Este complejo general requeriría la interacción de alguna proteína de reconocimiento específico de los transcritos sobre los que actuar.

Por otra parte, otros ensayos *in vitro* señalan que la proteína RB38 no se une a la región 5'UTR de *rbcl*, cuando se utiliza como RNA competidor en ensayos de interacción entre RB38 y la 5'UTR de *psbA* (Barnes *et al.*, 2004). Este resultado contradictorio podría ser debido a diferencias en la longitud e incluso secuencia de la región 5'UTR *rbcl* empleada en cada estudio. Como se ha visto en el capítulo 2, la conformación de la región 5'UTR resulta esencial para la interacción entre el elemento *cis* y la proteína de reconocimiento, ya que cualquier modificación de la conformación silvestre del elemento *cis* afecta a la estabilidad del transcrito quimérico. La síntesis *in vitro* de un RNA es particularmente problemática si hay que atender a determinados requisitos de secuencia en la región 5', ya que resulta difícil expresar *in vitro* un mensajero sin añadir nucleótidos extra en dicho extremo 5' (Walker *et al.*, 2003). Los promotores habituales de transcripción *in vitro* (T3, T7 o SP6) inician la transcripción antes de que termine el promotor, por lo que el extremo 5' del transcrito contiene siempre los 3 últimos nucleótidos del promotor. Además, en ocasiones se arrastran fragmentos del sitio múltiple de clonación del vector de expresión. La 5'UTR de *rbcl* transcrita para el ensayo *in vitro* de este estudio se diseñó especialmente teniendo en cuenta todos los requisitos estructurales necesarios para mantener la estabilidad del transcrito. Así pues, la disparidad de resultados entre el trabajo de Barnes *et al.* (2004) y el aquí presentado puede ser debida a este motivo y no al hecho de que RB38 no se una en realidad a la región 5' no traducible de *rbcl*.

La localización de la PDI tanto en el estroma como en la fracción de LDM apoyaría la idea de que esta proteína estuviera implicada tanto en la regulación redox de la traducción de *psbA* como en la de la estabilidad de *rbcl*, ya que cada uno de estos eventos tienen lugar en una localización diferente dentro del cloroplasto (Nickelsen, 2003).

## 2. Importancia de los resultados *in vivo* y problemas de la metodología de identificación empleada.

Los resultados aquí presentados se han obtenido poniendo de manifiesto interacciones RNA-proteínas mediante una aproximación bioquímica *in vivo*. Generalmente, los estudios en *C. reinhardtii* en los que se emplean metodologías bioquímicas identifican factores proteicos que interaccionan con transcritos específicos mediante ensayos *in vitro*. La ventaja que aporta el sistema de identificación aquí empleado es que “congela” una interacción que tiene lugar *in vivo* en el cloroplasto. Por otro lado, este sistema de detección de interacciones RNA-proteína *in vivo* conlleva a su vez alguna desventaja.

El gen quimérico empleado en el experimento contiene la región 5'UTR del gen endógeno *rbcl* de *C. reinhardtii* y el gen *uidA* como reportero. La presencia de dos regiones reguladoras idénticas en dos transcritos distintos en el cloroplasto hará que las proteínas de reconocimiento y unión a esta región se repartan entre los 2 tipos de RNAs distintos. Además, sobre el gen endógeno existe una fuerte presión de selección que no existe en el gen quimérico. Con las generaciones esto puede desencadenar una pérdida en el número de copias del gen quimérico y, por tanto, una disminución del número de transcritos quiméricos finales portadores de la 5'UTR. Esta razón podría explicar el hecho de que la banda de aductos de RNA-proteínas sea débil, encontrándose en el límite de detección.

El empleo de luz ultravioleta como formador de enlaces covalentes puede causar una segunda desventaja. Se puede decir que la irradiación puede causar estrés celular y, por tanto, que las condiciones del ensayo no reflejen al 100% las condiciones normales *in vivo*. Así pues, entre las proteínas que en *in vivo* interaccionen con la 5'UTR de *rbcl* podría aparecer alguna proteína cuya presencia se deba a esta situación particular. Prueba de ello podría ser la identificación por MS/MS de dos proteínas relacionadas con estrés por choque térmico.

La proteína de reconocimiento específico de la 5'UTR de *rbcl* no está descrita, por lo que surge un problema a la hora de buscarla mediante secuenciación de proteínas. El sistema de secuenciación por MS/MS se basa en la búsqueda de fragmentos teóricos de digestión con proteasas de las proteínas incluidas en las bases de datos. Si la proteína no está descrita en éstas no podrá



ser detectada en la secuenciación por sus fragmentos peptídicos. Así pues, con esta aproximación sólo podemos encontrar proteínas ya descritas y a partir de éstas cercar la búsqueda a las proteínas específicas. Por ejemplo, la secuenciación podría haber identificado el homólogo de la proteína de reconocimiento específico de la 5'UTR de *rbcl* en *G. violaceus*. Aunque esta proteína no la hemos utilizado para nuestra aproximación inicial, porque no está a nuestro alcance el gen clonado y no existe información acerca de su posible función, se tendrá en cuenta para estudios futuros.

En el experimento llevado a cabo, la única normalización realizada de la cantidad de aductos secuenciados, tanto en la muestra control como en la muestra problema, fue la utilización de la misma cantidad de células. Es posible que exista un sesgo en el muestreo debido a la cantidad de material secuenciado y al umbral de detección del sistema de MS/MS. Si en la muestra control había menos aductos que en la muestra problema este análisis puede presentar menos proteínas identificadas y, por tanto, se habrán identificado falsos positivos. Por ello, se tomó un criterio bastante conservador a la hora de elegir el tamaño de la muestra del control pero, aún así, puede que exista esa posibilidad. Lo más adecuado sería corroborar *in vitro* todas las supuestas interacciones.

### 3. Hipótesis del origen evolutivo del sistema de regulación de la estabilidad de *rbcl* en *C. reinhardtii*.

El genoma cloroplástico de *C. reinhardtii* contiene dos copias del elemento móvil Wendy situadas en posiciones opuestas en el genoma (Fan *et al.*, 1995). Un fragmento de 99 pb del elemento Wendy está repetido en el genoma una tercera vez, constituyendo la región líder de *rbcl*. El alineamiento de estas dos secuencias muestra una identidad prácticamente del 99%, con la introducción de una G en la posición +44 de la región 5'UTR de *rbcl* (Dron *et al.*, 1982). La región líder de *rbcl* en *C. reinhardtii* no presenta ninguna homología con la misma secuencia de cualquier otro organismo fotosintético, ni se ha encontrado en otro genoma hasta el momento (Fan *et al.*, 1995). Como se ha demostrado y documentado en este trabajo, la región líder del transcrito de la subunidad grande de la Rubisco contiene elementos *cis* esenciales para la estabilidad de

los mismos y, por tanto, para el control postranscripcional de la expresión génica.

Hay evidencias de que las 99 pb de la región 5' no traducible de *rbcl* se han movido con la ayuda de la putativa transposasa o integrasa codificadas por el elemento móvil (Dron *et al.*, 1982). Si en algún momento de la evolución la región que controlaba la estabilidad del mRNA de *rbcl* se vio sustituida por la incorporación súbita de este fragmento del elemento Wendy, alguno de los mecanismos de regulación ya existente en la célula debió asumir esa función. Otras proteínas, que en el orgánulo reconocieran y modularan la unión a algún otro mensajero, podrían ser "raptadas" para prestar esa función en el transcrito de *rbcl*. Así pues, las proteínas PDI y RB38, que hasta ese momento controlaban la traducción de *psbA*, podrían pasar a desempeñar la función de unirse a la 5'UTR de *rbcl* y dirigir su estabilidad o influir en su traducción. Esta sustitución supondría un mecanismo evolutivo de cambio rápido y eficaz: el de que una proteína con una función en un transcrito determinado adquiriera la misma función u otra similar en un transcrito distinto. Este cambio evolutivo pudo tener lugar como consecuencia de la inserción de esta secuencia. Esto podría explicar por qué la región 5'UTR de *rbcl* en *C. reinhardtii* no comparte homología con el resto de las especies en las que existe la enzima Rubisco. Otros fenómenos similares se han documentado en el cloroplasto. Se han purificado las proteínas RB47 y RB60 (PDI) de la 5'UTR de *psbA* mediante una cromatografía de afinidad y se sabe que éstas derivan del genoma ancestral del hospedador (Kim y Mayfield, 1997; Yohn *et al.*, 1998). RB47 pertenece a la familia de proteínas de unión a la cola poliA. En el citoplasma participa en el inicio de la traducción interaccionando con la cola poliA y con otras proteínas que se unen al extremo 5' del mRNA. En el cloroplasto también interacciona con el RNA, en este caso lo hace directamente con la 5'UTR de *psbA* (Yohn *et al.*, 1998). Otro ejemplo de proteínas que al pasar al genoma del hospedador han cambiado no sólo su sustrato, como en el caso anterior, sino también su función, puede ser el de las proteínas CRS2 de maíz y MAA2 de *C. reinhardtii*. Presentan respectivamente homologías con una peptidil tRNA hidrolasa y con una pseudouridina sintetasa. Estos genes procederían del genoma del endosimbionte y la habilidad de ambas de interaccionar con el RNA les permitió adquirir nuevas funciones en el cloroplasto, como chaperonas de RNA implicadas en el corte y unión de los

RNAs del grupo de intrones II (Barkan y Goldschmidt-Clermont, 2000). En el caso de la PDI y RB38 el cambio de función propuesto no ha sido muy drástico, ya que presentan una función similar en otras regiones 5'UTR, dentro del mismo compartimento. En el cloroplasto estas proteínas pueden presentar multifuncionalidad al formar parte de complejos RNPs de unión general a distintos mensajeros, regulando la estabilidad y otros procesos postranscripcionales.

#### 4. Necesidad de estudios futuros.

En este trabajo se ha llevado a cabo un primer paso en la búsqueda de la proteína específica implicada en la estabilidad de los transcritos de *rbcL* en *C. reinhardtii*. Hasta el momento sólo se han conseguido identificar proteínas que también se unen a otros transcritos cloroplásticos. Estas proteínas resultan prometedoras ya que, a través de ellas, se pueden diseñar nuevas aproximaciones que permitan acotar la búsqueda de las proteínas de unión específicas.

La capacidad de una proteína para unirse a una secuencia de RNA específica no es suficiente para concluir que presenta una función en un proceso particular (Fedoroff, 2002). Para ello, es necesario correlacionar la presencia o ausencia de esta unión con un genotipo nuclear implicado en la expresión génica cloroplástica, que permita corroborar esa actividad. Por lo tanto, estudios genéticos y bioquímicos deben complementarse entre sí, para poder dilucidar los mecanismos bioquímicos de la traducción y su relación con los procesos de estabilidad y procesamiento de los RNAs (Barkan y Goldschmidt-Clermont, 2000). Así pues este estudio en el futuro requerirá la confirmación mediante más pruebas bioquímicas, que corroboren la especificidad de la unión de estas proteínas a la región 5'UTR de *rbcL*, y mediante el análisis de algún mutante nuclear que confirme estos resultados.

## CAPÍTULO 4

**Mecanismo de degradación de los RNAs.**

## Introducción.

La alta tasa de reemplazo de los mensajeros, rápida síntesis y rápida destrucción, es una de las características generales más destacables de los mRNAs. Es probable que la vía normal de un transcrito sea la degradación y que los mRNAs maduros queden protegidos de ésta por proteínas de unión a RNA o por estructuras secundarias (Stern D.B. y Drager R.G., 1998). La inestabilidad de los mRNAs permite a las células adaptar su patrón de proteínas continuamente a las necesidades biológicas cambiantes (Meyer *et al.*, 2004). Los rRNAs y los tRNAs son los más estables, sólo se degradan bajo ciertas condiciones de estrés o si la molécula de RNA es defectiva. Al representar más del 98% del RNA de una célula procariota pueden suponer un importante reservorio de nutrientes en condiciones de inanición (Deutscher, 2006). Aunque la degradación de los mRNAs se ha descrito como un aspecto importante de la regulación de la expresión génica en todos los organismos, los mecanismos moleculares de degradación del RNA están relativamente poco explorados.

### 1. Degradación de los mRNAs en eucariotas.

La vida media de los mRNAs viene marcada por señales específicas que determinan y aceleran el decaimiento individual de los mensajeros. Los mRNAs, desde que se sintetizan en el núcleo, forman complejos RNPs cuya composición proteica va cambiando y, así, protegen a la molécula de las ribonucleasas, permiten su exportación desde el núcleo y dictan su destino en el citoplasma.

En levaduras, organismo en el que más se ha progresado en el estudio de la degradación de los mRNAs eucariotas, se han descrito mecanismos generales de degradación de los mRNAs (figura 4.1). La gran mayoría de los mensajeros eucariotas comienzan su degradación por un mecanismo dependiente de la desadenilación del mRNA por la acción de distintas desadenilasas. Las enzimas implicadas en la desadenilación de los mensajeros eucariotas se pueden agrupar en 3 complejos enzimáticos diferentes (CCR4-NOT, PAN y PARN). Cada complejo de desadenilasas parece tener preferencia por un tipo de complejo mRNP y la remodelación de éstos alterará su susceptibilidad a las distintas desadenilasas (Parker y Song, 2004). La acción de las desadenilasas puede ser

un proceso reversible ya que el extremo 3' se puede adenilar nuevamente y el mRNA pasar otra vez a la traducción en los polisomas (Garneau *et al.*, 2007). La vía preferente de degradación de los mensajeros, una vez acortada la cola poliA, es la eliminación de la caperuza en 5', por la enzima Dcp1-Dcp2, exponiendo el extremo a la acción de la exonucleasa 5'→3' (XRN1) (Parker y Song, 2004). La eliminación de la protección del extremo 5' es un proceso irreversible y, por tanto, altamente regulado. Existe otra ruta de degradación, tras la desadenilación, que tiene lugar en sentido 3'→5' y es llevada a cabo por la acción del exosoma. El exosoma es un complejo enzimático, con al menos 11 exonucleasas 3'→5', que forman una estructura en anillo y se localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma. Este complejo funciona en distintas reacciones de procesamiento del RNA en el núcleo y en la degradación de los mRNAs citosólicos (Parker y Song, 2004). Estas dos vías de degradación no son mutuamente excluyentes aunque, actualmente, la contribución de cada uno de estos mecanismos en el proceso global de degradación de los mRNAs queda por determinar (Garneau *et al.*, 2007).

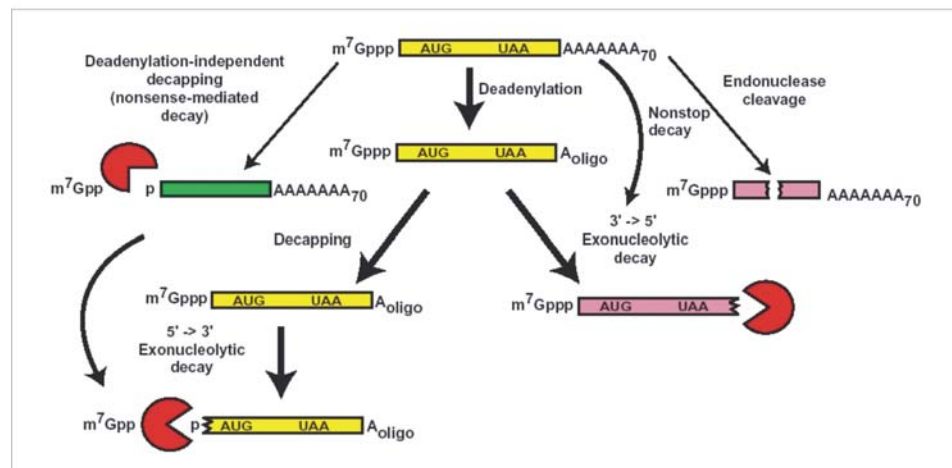


Figura 4.1. Vías de degradación de los mRNAs eucariotas. Parker y Song, 2004.

*In vivo* se ha correlacionado la degradación de los mensajeros desde el extremo 5' con la entrada de los mismos en unas estructuras citoplasmáticas denominadas gránulos P, donde se localizan todas las enzimas implicadas en la

degradación 5'→3' (proteínas DCP, XRN1...). Se ha observado que el tamaño y el número de gránulos P varían según el flujo de mRNAs que entran en la vía de degradación desde el extremo 5'. Parece que estos gránulos P se ensamblan y desensamblan según las necesidades celulares de traducción de los mRNAs o de su degradación (Garneau *et al.*, 2007). Además de los gránulos P, en eucariotas superiores, se han identificado otros complejos RNP que presentan algunos componentes y funciones comunes con los gránulos P, como almacenaje de mRNAs no traducidos (Eulalio *et al.*, 2007). Bajo condiciones de estrés celular se detiene la traducción de algunos mRNAs y los polisomas se dirigen a gránulos de estrés, donde quedarán almacenados hasta que el estrés se haya superado. Así, los gránulos de estrés son estructuras dinámicas y reversibles y contienen componentes implicados en la traducción del mRNA (factores de iniciación y subunidades ribosomales 40S). La traducción y degradación localizada de mRNAs parece suponer un mecanismo fundamental para alcanzar una distribución asimétrica, tanto espacial como temporal, de los componentes celulares (Eulalio *et al.*, 2007).

También se han descrito dos mecanismos alternativos para la degradación de mRNAs aberrantes. Uno es el de degradación mediada por codones sin sentido, en la que la maquinaria que reconoce un codón de parada prematuro recluta a la maquinaria de eliminación de la cabecera del mRNA, evitando el paso de desadenilación del mRNA (Mitchell y Tollervey, 2003). Si el mensajero es defectuoso por la ausencia de un codón de parada (degradación mediada por ausencia de codón de parada) el mRNA en el citoplasma entra directamente, sin sufrir proceso de desadenilación, en la vía de degradación del exosoma (van Hoof y Parker, 2002).

En levadura, un pequeño número de mRNAs son degradados por un mecanismo mediado por endonucleasa específica de secuencia. Esta vía parece ser más importante en mamíferos, pudiendo constituir la vía principal de degradación de los mRNAs en estos organismos. La degradación se inicia con un corte interno del mRNA el cual generará dos fragmentos, cada uno de ellos con un extremo no protegido (Parker y Song, 2004). Estos fragmentos serán degradados por la exonucleasa 5'→3' (XRN1) y vía degradación 3'→5', según el extremo desprotegido que presenten.

## 2. Degradación de mRNAs en procariotas.

Puesto que los cloroplastos de las algas verdes proceden de la endosimbiosis primaria de una cianobacteria, una visión general de la degradación de mRNAs en procariotas podría contribuir a la comprensión de los mecanismos implicados en la estabilidad de los mRNAs en este orgánulo.

Las características que protegen a los mRNAs procariotas de la degradación incluyen la presencia de una o más estructuras secundarias en 5' y 3' y el sitio de unión del ribosoma (RBS) (Emmory *et al.* 1992; Hambræus *et al.* 2002). Estos elementos comunes a todos los mensajeros son dianas para la unión de proteínas que constituyen una barrera física para el avance de las ribonucleasas. La maquinaria responsable de la degradación de los RNAs es general y, a menos que un RNA esté correctamente protegido, será diana para las RNasas. La estabilidad de los transcritos es consecuencia de los elementos *cis* específicos de cada transcrito que controlan la accesibilidad de las RNasas al sitio en el cual pueden actuar para iniciar la degradación. Esta protección puede implicar la formación de una estructura terciaria, el ensamblaje en una RNP o la protección de los extremos (Deutscher, 2006).

El mecanismo de degradación de RNAs en *E. coli* implica un ataque endonucleolítico del mRNA, la poliadenilación en 3' de los fragmentos de RNA resultantes y la degradación exonucleolítica en sentido 3'→5' de los fragmentos. En bacterias, la presencia de una cola poliA en 3' se asocia a la degradación de los RNAs, ya que se requiere como punto de anclaje al extremo 3' de las exorribonucleasas (Deutscher, 2006). La poliadenilación en procariotas es un proceso relativamente indiscriminado que puede tener lugar en los extremos 3' de los RNAs (Sarkar, 1997).

Existen dos endorribonucleasas principales, la RNasa E y su homóloga la RNasa G, implicadas en el proceso de degradación de los mRNAs. Su actividad es dependiente de la unión al extremo 5' libre, preferentemente monofosforilado, y cortan en RNA no estructurado con segmentos ricos en AU (Kushner, 2002). La RNasa E está implicada en la degradación de muchos mRNAs formando parte del degradosoma y también participa en el procesamiento de los rRNAs y tRNAs. Se une al extremo 5' y corta a cierta distancia de éste, recorriendo el transcrito desde el extremo 5' en dirección 5'→3' hasta alcanzar la secuencia de corte (Coburn y Mackie, 1999). Otras



endorribonucleasas son la RNasa M, la RNasa I y la RNasa III, que es la única descrita que corta RNA de doble cadena, en el tallo de estructuras en horquilla.

Está ampliamente aceptado que la primera enzima que inicia la degradación es la RNasa E aunque algunos autores plantean dudas sobre si ésta es realmente la enzima que inicia la degradación de los mRNAs. El producto de corte de la RNasa E presenta extremos 5' monofosforilados, sin embargo, los extremos 5' de la mayoría de los fragmentos de RNA observados tienen extremos 5'OH. Es por ello por lo que algunos autores, como Cannistraro y Kennell, proponen a la RNasa M como la principal endorribonucleasa que actúa en la degradación de los mRNAs de *E. coli*. A pesar de que la RNasa M produce extremos 5'OH y es una enzima de especificidad de sustrato más general, sólo se ha detectado en una cepa concreta de *E. coli* y se ha identificado como una enzima periplasmática, por lo que no parece ser la enzima más adecuada para iniciar la degradación de los mRNAs (Kushner, 2002).

En la degradación de un mRNA en bacterias, tras el corte endonucleolítico tiene lugar la poliadenilación en 3' por la poliA polimerasa (PAP) del fragmento resultante. Puesto que en *E. coli* no se ha descrito ninguna enzima exonucleasa 5' → 3', todos los oligorribonucleótidos generados por cortes internos serán exclusivamente degradados exonucleolíticamente en dirección 3' → 5', por la acción de la polinucleótido fosforilasa (PNP) y las exorribonucleasas RNasa II y RNasa R. Las tres enzimas presentan *in vivo* funciones solapantes. Tras repetidos ciclos de poliadenilación y degradación exonucleolítica los oligorribonucleótidos finales, demasiado cortos, serán sustrato de una oligorribonucleasa.

Se postula que la poliadenilación de mRNAs para su degradación tiene lugar por dos enzimas distintas (PAP y PNP), de forma que, en ausencia de una vía de poliadenilación funciona la otra. La enzima PAP sintetiza colas poliAs homogéneas, de longitudes entre 10 y 40 nucleótidos, compuestas únicamente por adeninas. Sólo un pequeño porcentaje de RNAs presentan colas poliA heterogéneas, con residuos de C y U. Éstas han sido sintetizadas por la polinucleótido fosforilasa. *In vitro* la PNP de *E. coli* actúa como polimerasa o como fosfatasa en función del ratio ADP/Pi de su entorno (Yehudai-Resheff *et al.*, 2001; Mohanty y Kushner, 2000).

En *E. coli* se ha descrito un complejo RNP llamado degradosoma que contiene todas aquellas enzimas implicadas en el proceso de degradación de los RNAs (Jain *et al.*, 2002; Kushner, 2002). Es un complejo RNP formado por la RNasa E, la PNP, una RNA helicasa que reconoce elementos DEAD de RNA (RhlB), algún RNA pequeño y la enzima enolasa. La RhlB RNA helicasa eliminará las estructuras secundarias preparando el sustrato para la acción de la PNP. No se conoce cual es la función de la enolasa en este complejo. Aunque el modelo de degradación de los mensajeros a través del degradosoma ha sido ampliamente aceptado en la actualidad, se ha observado que en mutantes en los cuales no se forma el degradosoma el proceso de degradación de algunos RNAs no se ve afectado, lo que plantea dudas sobre si el degradosoma es el único mecanismo de degradación de los RNAs en *E. coli* (Ow *et al.*, 2000).

Estudios llevados a cabo en *E. coli* sobre los determinantes de la estabilidad de los mRNAs indican que la presencia de una horquilla, cuya secuencia concreta es relativamente poco importante, en el extremo 5' terminal de los mensajeros procariotas prolonga su vida media *in vivo*. Además, la adición de 5 nucleótidos libres en simple cadena en el mismo extremo del mensajero es suficiente para dirigir el mensajero a la vía de la degradación. Todo ello apunta a que la unión de endorribonucleasas, como la RNasa E, requieren la interacción con el extremo 5' antes de cortar internamente en uno o más puntos distantes (Bouvet y Belasco, 1992; Emory *et al.*, 1992). La dependencia catalítica de la RNasa E por el extremo 5' de su sustrato podría proporcionar una explicación adecuada a la direccionalidad de la degradación de los mensajeros (Mackie, 1998).

Se han propuesto mecanismos generales de regulación de la degradación de los mRNAs. En primer lugar, la síntesis de muchas de las proteínas implicadas en la vía de degradación de los mRNAs está bajo algún tipo de control postranscripcional. Por ejemplo, la RNasa III, la PNP y la RNasa E autorregulan su propia síntesis en función de la concentración de la enzima. Además de esta regulación directa e individual, otras proteínas están implicadas en el mantenimiento de su abundancia. Por ejemplo, la RNasa III regula la síntesis de la PNP. Por último, la poliadenilación también juega un papel importante en el control de la capacidad degradativa de la célula. Cuando la concentración de fragmentos de RNAs poliadenilados es alta aumenta la capacidad de la

RNasa E y PNP de unirse a estos fragmentos a la vez que aumenta su afinidad por sus propios mensajeros generando una retroalimentación positiva al estabilizar sus transcritos y aumentar así su traducción (Kushner, 2002). La longitud de las colas poliA y el porcentaje de Gs que contienen influyen en la tasa de degradación *in vitro* (Monde *et al.*, 2000).

### 3. La degradación de mRNAs en cloroplastos.

Aunque muchas características del sistema de expresión génica cloroplástica parecen procariotas existen diferencias significativas, que también se observan en el mecanismo de degradación del RNA, en parte debido a que el metabolismo de los mensajeros plastídicos y las enzimas implicadas en él están controlados por el núcleo y regulados por la luz o el estado redox del orgánulo (Schuster *et al.*, 1999). Mediante estudios llevados a cabo con transcritos quiméricos y el análisis de mutantes, se han determinado algunos elementos de secuencia en mensajeros concretos, el papel fundamental que juega la región 5'UTR en la regulación de la estabilidad de los mismos y el efecto de la región 3'UTR en su vida media. También se han caracterizado algunas proteínas implicadas en el sistema de degradación pero, hasta la actualidad, no se ha podido postular el mecanismo general de degradación de los mensajeros cloroplásticos, ni se ha caracterizado con detalle la maquinaria enzimática implicada en este proceso.

En los cloroplastos se ha identificado una exonucleasa implicada en el procesamiento del extremo 3' que presenta una alta homología con la PNP bacteriana. La enzima PNP cloroplástica no forma parte de un complejo como el degradosoma, pero se ha encontrado formando homoligómeros de aproximadamente 600 kDa que presentan alta afinidad por secuencias de RNA poliadeniladas. Esto supone una diferencia con el mecanismo de degradación de los mRNAs en *E. coli* (Baginsky *et al.*, 2001).

Parece que el mecanismo de degradación de mensajeros en el cloroplasto, como en procariotas, se inicia con un corte endonucleolítico y que la adenilación del extremo 3' de esos fragmentos acelera la degradación de los oligorribonucleótidos *in vitro* (Hayes *et al.*, 1999; Schuster *et al.*, 1999). Se requiere la adición de la cola poliA a los productos del corte endonucleolítico para la rápida degradación exonucleolítica por la PNP cloroplástica en sentido 3'→5'

(Kudla *et al.*, 1996; Lisitsky *et al.*, 1997). Sin embargo, en los cloroplastos de plantas superiores las colas poliA de los mensajeros son heterogéneas (70% de As y 25% de Gs) y más largas que las de bacterias (hasta 270 nucleótidos). Una posible explicación es la ausencia de la enzima PAP y la enzima que en su lugar adenila los extremos 3' de los fragmentos de RNA es la PNP cloroplástica. Únicamente en el cloroplasto del alga verde *C. reinhardtii* se han detectado RNAs con colas poliA homogéneas y de longitudes similares a las de células procariotas, entre 20-50 nt, indicando la posible existencia de una PAP en el cloroplasto de esta alga. Los mecanismos de poliadenilación (por la PNP) y degradación de RNAs (en ausencia de degradosoma) presentes en cianobacterias y cloroplastos de plantas superiores son muy similares entre sí pero distintos a los de *E. coli*. Se ha postulado que representarían el sistema de degradación de RNA más ancestral.

Otra diferencia con procariotas es que, en el cloroplasto, se ha postulado la existencia de una vía de degradación exonucleolítica en sentido 5'→3'. En el cloroplasto de *C. reinhardtii* se han descrito evidencias que apoyan la existencia de una actividad exonucleasa 5'→3'. Drager y colaboradores (1999) caracterizaron un mutante no fotosintético (F16) defectuoso en una proteína nuclear, *mcd1-1*, lo que conduce a la inestabilidad de los transcritos cloroplásticos del gen *petD*. Parece que la proteína MCD1-1 se une a la región 5'UTR de *petD* impidiendo el avance de la exorribonucleasa 5'→3' ya que la ausencia de esta proteína, en el fondo genético del mutante, puede sustituirse por la inserción de una cola de poliGs. Esta actividad exonucleasa ha sido detectada en *S. cerevisiae*, en *Trypanosoma brucei* y en humanos, aunque no en bacterias. Esto sugiere que, si esta exonucleasa 5'→3' está presente en los cloroplastos, ha sido adquirida desde el genoma del hospedador endosimbiótico (Drager *et al.*, 1999b).

En el cloroplasto se ha sugerido que los mecanismos de regulación de la degradación de los mRNAs podrían estar mediados por distintos factores como la concentración de iones magnesio, la asociación con RNPs o con los ribosomas, que regularían la accesibilidad a los sitios de corte del RNA y la actividad tanto de la PNP, en la poliadenilación, como de las ribonucleasas, en la degradación. Además, como el resto del metabolismo del cloroplasto, la

degradación de los mRNAs está controlado por el núcleo y regulado por la luz y por el estado redox del orgánulo (Hayes *et al.*, 1999).

## Resultados.

### 1. ¿Afecta a la estabilidad de los transcritos en el cloroplasto la presencia de nucleótidos extra libres en el extremo 5'?

La primera aproximación para estudiar el mecanismo molecular de la degradación de los mRNAs en el cloroplasto fue determinar si la presencia de ribonucleótidos libres en el extremo 5' del mRNA aumenta la susceptibilidad del transcrito a la degradación, como se ha demostrado en estudios previos en *E. coli* (Bouvet y Belasco, 1992; Emory *et al.*, 1992). Para ello, se analizó una serie de genes quiméricos portadores de la región líder de *rbcl*, que, sin alterar la conformación de la 5'UTR endógena de *rbcl*, contiene nucleótidos extra desapareados en su extremo 5'. Las modificaciones extienden en 1, 3, 4, 6 y 8 ribonucleótidos libres la 5'UTR (figura 4.2.A y B).

Con objeto de analizar la estabilidad de estos transcritos se determinó su abundancia mediante Northern blot. Podemos observar que, en todos estos casos, estos RNAs son suficientemente estables para que *in vivo* se acumulen en cantidades detectables (figura 4.2.C). Se aprecia que la abundancia detectada es menor cuando los nucleótidos libres desapareados superan los 4 nucleótidos. Parece que, como en *E. coli*, la adquisición de una cola en el extremo 5' aumenta la susceptibilidad del transcrito a la degradación, una vez superada una longitud mínima.

### 2. Determinación del extremo 5' de los transcritos quiméricos.

Se ha postulado que, en el cloroplasto, existe una actividad exonucleasa 5'→3' y que las estructuras secundarias en los extremos 5' de los transcritos pueden tener la función de protección frente a la degradación. Puesto que los transcritos modificados con nucleótidos extra en 5' son suficientemente estables para ser analizados, a pesar de presentar un extremo 5' libre, se pretende determinar qué ribonucleótido está presente en la posición 5' de los transcritos acumulados (figura 4.2). Todos estos transcritos quiméricos analizados conservan la misma estructura secundaria, necesaria para su estabilidad en las condiciones de estudio, que el mensajero endógeno. En caso de existir esta exonucleasa podría anclarse al extremo 5' libre y degradar únicamente los

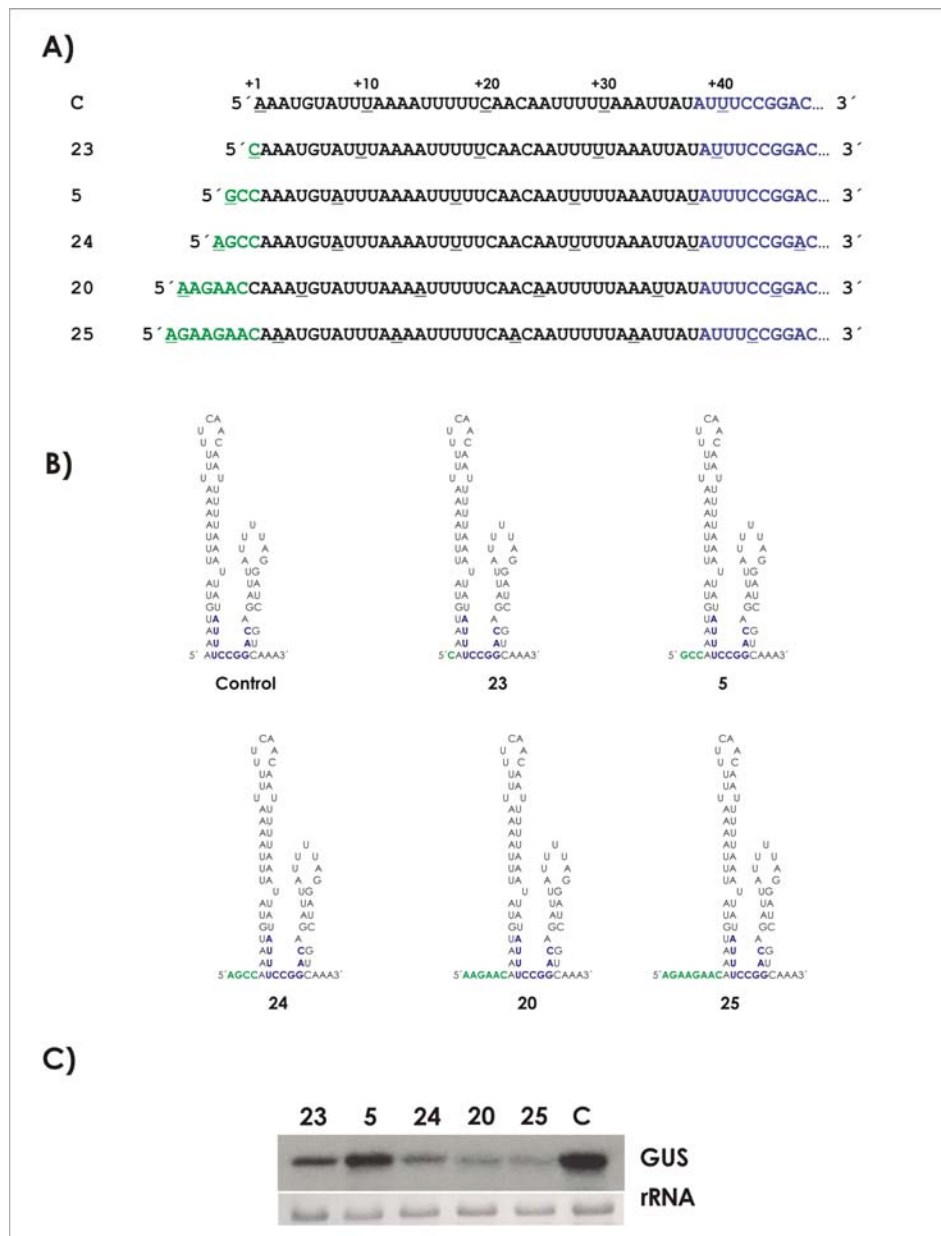


Figura 4.2. Efecto de la adición de nucleótidos extra en el extremo de la 5'UTR de *rbcl* sobre la estabilidad de mRNAs quiméricos. A y B) Secuencias del extremo 5' de transcritos quiméricos con nucleótidos extra en 5' (23, 5, 24, 20 y 25) y sus estructuras secundarias, según el programa de predicciones m-fold. C) Northern blot de estas construcciones quiméricas. Para más detalles figura 2.2.

ribonucleótidos extra. Una vez alcanzado el tramo de RNA de doble cadena de la primera horquilla su actividad podría verse detenida debido al impedimento físico que esta estructura supone. En ese caso, los transcritos resultantes de la actividad exonucleasa 5'→3' presentarán en la posición +1 el mismo ribonucleótido que el transcrito silvestre de *rbcl*, en lugar de los ribonucleótidos extra. Este resultado corroboraría la presencia de una actividad exonucleasa 5'→3' en el cloroplasto (figura 4.3).

Para analizar el extremo 5' de los transcritos se procedió, en primer lugar, a determinar la longitud de los cDNAs obtenidos mediante retrotranscriptasa (RT) con un oligonucleótido específico marcado con un fluoróforo (del mismo modo que en los análisis de fragmentos amplificados de microsatélites) empleando un secuenciador automático. El oligonucleótido empleado para realizar la RT se sitúa en la posición 146 del gen *uidA*, por lo que la longitud esperada, para un cDNA obtenido sobre el transcrito del gen quimérico control, será de 303 nucleótidos (157 nucleótidos de *rbcl* + 146 nucleótidos de la región codificante del gen *uidA*). Se analizaron los transcritos quiméricos con 1, 3, 6 y 8 nucleótidos extra en 5', esperando, por tanto, fragmentos de cDNA de 304, 306, 309 y 311 nucleótidos, respectivamente, si mantuviera los ribonucleótidos extra del extremo 5'. En la tabla 4.1 se muestran los resultados obtenidos para cada transformante analizado mediante esta aproximación. En todos los casos se obtienen varios fragmentos del mismo tamaño, aunque la intensidad de fluorescencia de los distintos fragmentos señala diferencias en cuanto a su abundancia.



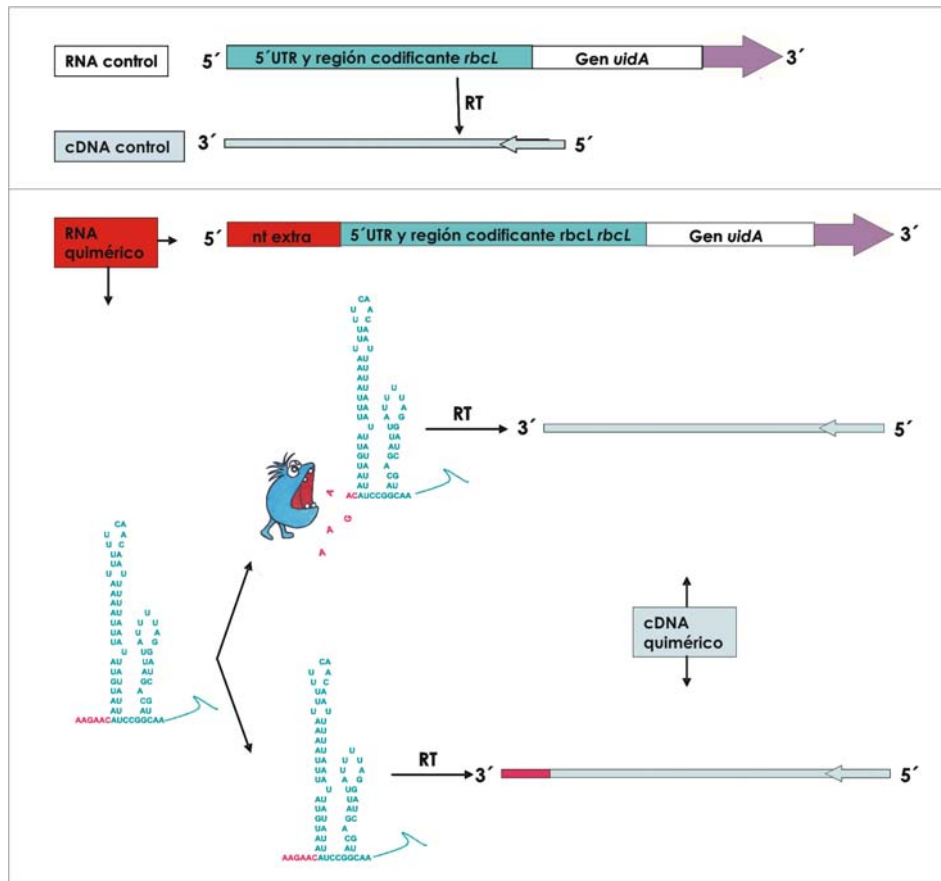


Figura 4.3. Aproximación para la determinación del extremo 5' de los transcritos quiméricos.

La utilización de este método para identificar los fragmentos de cDNA quiméricos presenta dos problemas: el primero es que para cada transcrito quimérico aparece más de un tamaño de cDNA y el segundo, y más importante, que ninguno de los fragmentos presenta un tamaño que concuerde con el tamaño esperado. El sistema de asignación de los fragmentos detectados, en nuestro caso, parece que no determina correctamente los tamaños de los fragmentos de cDNA y, por tanto, este sistema de detección de fragmentos de cDNA, en las condiciones utilizadas, no es adecuado para el objetivo de nuestro estudio.

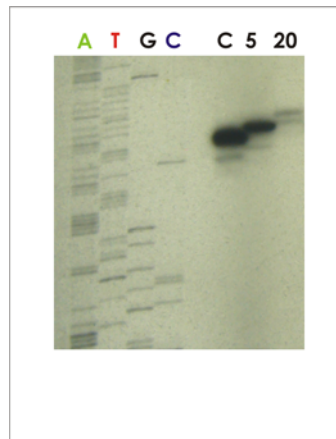
	Longitud en nucleótidos de los fragmentos identificados						
	172.75	218.84	328.03	339.98	427	444.0	463.09
Control	2935	303	173	109	∅	2299	176
23	12604	2453	1009	651	517	2441	1141
5	3270	480	233	157	132	828	271
20	3707	1035	414	276	224	728	370
25	5428	670	344	185	147	2811	294

**Tabla 4.1. Análisis de fragmentos, marcados con un fluoróforo, obtenidos al realizar una RT sobre distintos RNAs quiméricos con nucleótidos extra en el extremo de la 5'UTR.** Para cada transcrito quimérico se especifica la intensidad de fluorescencia detectada en los distintos fragmentos identificados. La intensidad de fluorescencia será directamente proporcional a la cantidad de cDNA de un tamaño dado.

Por ello, se decidió determinar el extremo 5' de los transcritos mediante el sistema tradicional de extensión del cebador. Comparando la movilidad de cada cDNA con la reacción de secuenciación del mismo gen se puede conocer el tamaño exacto de cada cDNA y qué nucleótido ocupa la posición +1 del cDNA. Para este experimento se emplearon cDNAs obtenidos de los transformantes con 3 y 6 nucleótidos extra. Los resultados obtenidos se representan en la figura 4.4.

En la autorradiografía se observa la reacción de secuenciación, las 4 primeras carreras, y las muestras de cDNA marcadas radiactivamente. Se ha utilizado como control del tamaño del cDNA del transformante control +157, que contiene la 5'UTR de *rbcL* y el principio de la región codificante hasta el nucleótido +157. El resultado con el cDNA control, en el que se observa una banda mayoritaria, indica que no hay procesamiento del extremo 5' del mRNA de *rbcL*. En el caso de las muestras de los transformantes 5 y 20 se observa que el tamaño del fragmento de cDNA observado es 3 y 6 nucleótidos mayor, respectivamente, que la muestra control +157. Esto indica que en la posición 5' de los transcritos quiméricos se mantienen los nucleótidos extra del RNA molde de la RT. Los resultados también indican que durante la síntesis de cDNA la RT no

debe de tener ningún problema importante de parada, ya que la banda más intensa en todos los casos se localiza en la posición +1 del cDNA.



**Figura 4.4. Experimento de extensión del cebador utilizando mRNAs quiméricos con nucleótidos extra libres en el extremo 5'.** Las carreras del 1 al 4 corresponden a las distintas reacciones de secuenciación: A, T, G y C. Para la realización de la RT se empleó un oligonucleótido localizado al principio de la región codificante del gen reportero *uidA* (desde el nucleótido 111 hasta el 131). La carrera C corresponde al cDNA del control (+157), mientras que las carreras 5 y 20 corresponden a cDNA de los transformantes con 3 y 6 ribonucleótidos extra, respectivamente.

Así pues, estos resultados indican que los transcritos con nucleótidos libres en 5' que han sido molde para la RT no han estado sujetos a ninguna actividad enzimática que elimine los ribonucleótidos que quedan fuera de la estructura en horquilla de la 5'UTR.

## Discusión.

### 1. El extremo 5' libre aumenta la inestabilidad de los transcritos cloroplásticos.

Los transcritos cloroplásticos presentan, en la región 5'UTR, elementos que regulan y gobiernan su estabilidad. Esto, sumado al pequeño papel asignado a la 3'UTR en el control de este proceso y a las evidencias que proponen la existencia de una actividad exonucleasa 5'→3' en el cloroplasto de *C. reinhardtii* (Drager *et al.*, 1999b) apoyan la idea de que la degradación de los transcritos cloroplásticos se inicia por el extremo 5'.

En *E. coli* se ha puesto de manifiesto la importancia del extremo 5' en la degradación de los RNAs al comprobar que la presencia de ribonucleótidos libres en este extremo del mRNA aumenta su inestabilidad (Bouvet y Belasco, 1992; Emory *et al.*, 1992). Los resultados aquí presentados apuntan a una situación similar en el cloroplasto. La presencia de ribonucleótidos libres extra en la posición 5' de la región líder de *rbcl*, que normalmente forma parte de una estructura secundaria, disminuye la estabilidad del transcrito. Estos resultados se ven apoyados por otros complementarios llevados a cabo recientemente en la Universidad de Oslo por el Dr. Uwe Klein (comunicación personal) que muestran que la adición de 15 y 20 nucleótidos extra en el extremo 5' reducen la cantidad de transcrito hasta al 1%, comparado con la del control. Estos datos confirman la importancia del papel del extremo 5' de la molécula en la estabilidad de los mensajeros y que este extremo es la diana para el reconocimiento de la maquinaria de degradación, aunque queda la duda de si la enzima participante es una exorribonucleasa 5'→3' o una endorribonucleasa dependiente del extremo 5', como se ha descrito en bacterias.

Como ya se ha comentado anteriormente, las variaciones de abundancia entre distintos transcritos quiméricos pueden ser debidas a una diferencia en el porcentaje de homoplasmicidad entre los transformantes. Todos los transformantes analizados se escogieron con, al menos, una homoplasmicidad del 80%. Por tanto, la cantidad de transcritos observada cuando éstos tienen 4, 6 y 8 nucleótidos extras indican que éstos presentan su estabilidad reducida al compararlos con el control y con los transformantes portadores de 1 y 3 nucleótidos extra. Las pequeñas diferencias observadas entre las cantidades de

transcritos de 23 y 5 podrían ser debidas al número de copias de genomas quiméricos y silvestres en el cloroplasto de cada transformante.

El hecho de que la abundancia de transcritos se vea afectada podría indicar que los ribonucleótidos libres en 5' en los transcritos son diana de la maquinaria de degradación. Otra posible causa del aumento de inestabilidad podría ser que, a partir de cierto número de nucleótidos extra, se altere el plegamiento de la primera horquilla *in vivo*, aunque el programa de predicción de estructuras secundarias no contemple esta opción. En ese caso, la proteína *trans* que media la estabilidad del transcrito, podría no reconocer el elemento *cis* y el transcrito resultante perdería su protección frente a la maquinaria de degradación.

## 2. Determinación del extremo 5' de los RNAs.

Se ha propuesto un sistema alternativo para determinar el extremo 5' de los RNAs, sin emplear radiactividad ni aumentar el número de copias por PCR. El sistema falla a la hora de asignar y determinar los tamaños de los fragmentos de los cDNAs. En primer lugar, se observa más de un fragmento de cDNA en cada transcrito. Esto podría deberse a que la RT detenga la síntesis de cDNA en algún punto por la presencia de alguna estructura secundaria fuerte que no quede desnaturalizada o por alguna secuencia en particular que afecte a su actividad y le obligue a detenerse. Mediante el sistema tradicional de extensión del cebador no se observan bandas de tamaños inferiores que puedan ser debidas a esta causa. El problema fundamental reside en que ningún tamaño detectado corresponde al tamaño del transcrito esperado si la RT llegara hasta el extremo 5' del RNA desde la posición de apareamiento del oligonucleótido específico empleado. Además, se observan fragmentos de tamaño mucho mayor al esperado cuyo origen resulta difícil de explicar. Por lo tanto, el sistema falla a la hora de asignar y determinar los tamaños de los fragmentos de los cDNAs. La única diferencia entre este sistema y el empleado para realizar el análisis de fragmentos de microsatélites consiste en que el producto marcado con el fluoróforo que se inyecta en el secuenciador es, en un caso, DNA de simple cadena, mientras que en el último es DNA de doble cadena (dsDNA). Los marcadores internos del secuenciador con los que se compara y calcula el tamaño de los fragmentos de cDNA también son moléculas de dsDNA. Así pues,

aunque las muestras estén tratadas antes de ser separadas en la electroforesis para que estén desnaturalizadas, puede que el comportamiento electroforético de los dos tipos de moléculas no sea el mismo, por lo que los tamaños asignados no se ajustan al tamaño real de los fragmentos.

### 3. Mecanismo de degradación de los transcritos cloroplásticos.

El análisis de los transcritos quiméricos con ribonucleótidos libres podría servir para apoyar la existencia de la actividad exonucleasa 5'→3' postulada en el cloroplasto de *Chlamydomonas*. Los transcritos detectados podrían presentar en el extremo 5' los ribonucleótidos extras incorporados al gen quimérico o el mismo extremo que el transcrito control, si esta enzima hubiera actuado sobre este extremo y la estructura secundaria de esta región hubiera bloqueado su avance evitando su degradación completa. Los resultados obtenidos no han servido para apoyar la actividad de esta enzima. El hecho de que los transcritos conserven los ribonucleótidos extras indica que, o la actividad exonucleasa 5'→3' no ha actuado sobre ellos, porque el fragmento de ribonucleótidos libres no es lo suficientemente largo como para que la enzima se una a este extremo, o que la enzima ha degradado completamente los transcritos y únicamente podemos ver la población de transcritos quiméricos que no han sido sustrato de la enzima. También podría ser que no exista esta actividad exonucleasa 5'→3' en el cloroplasto, como ocurre en *E. coli*, y el inicio de la degradación de los transcritos tenga lugar por la actividad de una endonucleasa, como ya se ha sugerido (Gruissem, 1989).

Como ya se ha descrito anteriormente, debe de existir una proteína que reconozca la conformación y secuencia de la 5'UTR interaccionando con el elemento *cis* de la 5'UTR de *rbCL* (Anthonisen *et al.*, 2001). Una característica distintiva del extremo 5' de la molécula de RNA es la presencia de, al menos, un grupo fosfato libre. Debido a la importancia de este extremo en la degradación, el reconocimiento de este grupo podría ser clave en este proceso. Los datos apuntan a que el extremo 5' de la molécula debe de ser reconocido para iniciarse la degradación. El mecanismo de degradación de los transcritos cloroplásticos podría ser resultado de la competencia, en este caso entre la unión del factor *trans* y de la exo o endorribonucleasa por reconocimiento de 5'. El extremo 5' de los transcritos silvestres quedaría resguardado por la

interacción del factor *trans*, lo que protegería al RNA de la degradación, gobernando su estabilidad. Esta proteína podría requerir para su unión además de la interacción con el elemento de estabilidad el reconocimiento del grupo fosfato del extremo 5'. En los transcritos quiméricos, los ribonucleótidos desapareados en el extremo 5' podrían ser blanco de unión de una exo o una endonucleasa dependiente del extremo 5'. La presencia de la proteína de protección supondrá una barrera física que dificultará espacialmente la unión y reconocimiento de la ribonucleasa. Esta situación podría tener lugar en las construcciones **23** y **5**, en las que el aumento de pocos ribonucleótidos en 5' no favorece, en especial, el anclaje de la RNasa. Por ello, la abundancia de estos transcritos no se ve alterada en comparación con la del control. En cambio, en las construcciones en las que hay más ribonucleótidos libres, al alejar el extremo 5' de la protección ofrecida por la estructura secundaria y por la unión del factor *trans*, los transcritos son susceptibles de ser atacados por la maquinaria ribonucleolítica. Cuando la extensión en el transcrito es de 6-8 ribonucleótidos, la RNasa puede anclarse con más facilidad, y aún más si las extensiones son de 15-20 ribonucleótidos. En estos casos, el factor *trans* no interacciona con el fosfato terminal, ya que queda alejado del entorno adecuado para esta unión, lo que hará que su interacción sea más débil, facilitando la degradación de los transcritos por la acción de la ribonucleasa en sentido 5'→3'.

La presencia de una estructura secundaria en la 5'UTR del mRNA de *rbcl*, que incluye el extremo 5' de la molécula y que forma parte de la diana reconocida por la proteína que lo estabiliza, podría ser la causa de su gran estabilidad (23 horas en oscuridad) en comparación con otros mensajeros cloroplásticos y con los de bacterias, en general, en los que el extremo 5' queda más expuesto a la maquinaria de degradación.

## CONCLUSIONES



1. En el inicio de la región 5' UTR del mRNA de *rbcl* no parece existir ningún elemento del promotor ya que ni la secuencia de esta región ni la distancia entre el promotor básico y el putativo promotor son esenciales para la correcta expresión del transcrito quimérico.
2. Cambios de la 5'UTR de *rbcl* en la secuencia entre +1 y +36 en transcritos quiméricos pueden afectar a la estabilidad de los transcritos, acelerando su velocidad de degradación más de 50 veces.
3. Algunas modificaciones de la 5'UTR hacen a los transcritos tan inestables que no permiten medir la velocidad de transcripción, por lo que resulta aconsejable contemplar la estabilidad en los ensayos de velocidad de transcripción.
4. La presencia de una estructura secundaria en el extremo 5' del mRNA de *rbcl* es esencial para la estabilidad de los transcritos.
5. La secuencia, la forma y el tamaño de la primera horquilla no es determinante para la estabilidad de los transcritos.
6. La estructura secundaria del extremo 5' *per se* no determina la estabilidad de los transcritos, su función es mediar el plegamiento del elemento de estabilidad en una conformación específica. Este plegamiento particular es el requisito real para la estabilidad de los transcritos de *rbcl*.
7. La segunda estructura secundaria de la 5'UTR de los transcritos de *rbcl* no juega un papel relevante en la estabilidad.
8. Se ha detectado *in vivo* la formación de aductos RNA-proteínas en transcritos portadores de la 5'UTR de *rbcl*.
9. Entre las proteínas identificadas formando parte de estos aductos específicos se pueden señalar PDI, RB38, la subunidad grande de la Rubisco, 14.3.3 y glr3844 como proteínas que pudieran estar relacionadas con la regulación de la estabilidad del mRNA de *rbcl*.
10. Las proteínas PDI y RB38 se unen, tanto *in vivo* como *in vitro*, a la región 5'UTR del mRNA de *rbcl*.
11. La presencia de ribonucleótidos extra en el extremo 5' del mensajero aumentan la inestabilidad de los transcritos en el cloroplasto.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Medios de cultivo y cepas de *Chlamydomonas reinhardtii* utilizadas.

La cepa mutante deficiente en *atpB*, CC-373 (au-uc-2-21), de *Chlamydomonas reinhardtii* se obtuvo del *Chlamydomonas* Genetics Center en Duke University, NC, USA y se utilizó como cepa receptora de todos los transgenes creados y analizadas. Las células del mutante no fotosintético CC-373, sensibles a la luz, se crecieron en agitación en erlenmeyers con 70 ml de medio salino HS (Sueoka, 1960) suplementado con acetato potásico (2.5 g/l) (HSHA), con luz tenue ( $\approx 0.05 \mu\text{mol/s.m}^2$ ) a 27° C. El cultivo se mantuvo en crecimiento durante dos semanas, diluyéndolo cada dos días. Antes de la transformación por biolística se inoculó un cultivo de HSHA de 500 ml en un erlenmeyer de 2 l que se creció durante 48 h.

Los transformantes fotosintéticos se crecieron en 200 ml de medio salino, HS (Sueoka, 1960), en un baño a 32° C con intensidad luminosa alta ( $50 \mu\text{mol/s m}^2$ ) y en fotoperíodos de 12 horas luz - 12 horas oscuridad. Los cultivos se agitaron mediante burbujeo con aire enriquecido con CO<sub>2</sub> al 2%. Estos cultivos se crecieron diluyéndolos diariamente hasta que el cultivo alcanzó una densidad celular de, al menos,  $2 \times 10^6$  células/ml. La densidad celular se determinó a partir de una alícuota del cultivo en la que se fijaron las células empleando formaldehído al 0.37% y se contaron usando un hemocitómetro Neubauer.

Todas las cepas utilizadas y los mutantes generados se mantienen en el laboratorio en placas de medio de cultivo HS o HSHA con Bacto-agar 15 g/l (Difco).

### 1. Modificaciones de la 5'UTR del mRNA de *rbcl* de *Chlamydomonas reinhardtii*.

La región 5' del gen *rbcl* usada en la mayoría de las construcciones se extiende desde la posición -70 a la posición +157, en relación con el inicio de la transcripción. Este fragmento incluye: el promotor del gen *rbcl*, la 5'UTR y una porción de la región codificante del gen que contiene una secuencia activadora de la transcripción alrededor de la posición +126 (Klein *et al.*, 1994). Esta región está fusionada al gen reportero *uidA* (GUS) y clonado en pBlueScript y este vector se denominó +157. Para la clonación de la batería de modificaciones se emplearon, inicialmente, las dianas de restricción existentes en la secuencia original del extremo 5' del transcrito, *SwaI* y *BspEI*, +1 y +40

Nombre	Oligonucleótidos
--------	------------------

--	--

Nombre	Oligonucleótidos
6	5' <b>GCGCG</b> AAATGTATTTAAATTTTCAACAATTTTAAATTATATTT3' 5' CCGGAAATATAATTTAAATTTGTTGAAAAATTTTAAATACATT <b>TCGCGC</b> 3'
7	5' AAATG <b>CGCCCGGGGCCCTGGTGGCCCGGGCG</b> ATTT3' 5' CCGGAAATA <b>CGCCCGGGGGCCACCAGGGGGCCCGGGCG</b> CATTT3'
8	5' AAAT <b>TATTAAATTTTAAACAATTTTAAATTTATG</b> ATTT3' 5' CCGGAAAT <b>CATAAATTTTAAAAAGTTGTTAAAAATTAATA</b> CATTT3'
9	5' AAATG <b>CGCCCGGGG</b> TTTTCAACAAT <b>CCCCGGGCG</b> ATTT3' 5' CCGGAAATA <b>CGGCCCGGGG</b> ATTGTTGAAAA <b>CCCCGGGCG</b> CATTT3'
10	5' AAATG <b>CGCCCGGGGCC</b> TTCAAC <b>GGCCCGGGCG</b> ATTT3' 5' CCGGAAATA <b>CGGCCCGGGGCC</b> GTTGAA <b>GGGCCCGGGCG</b> CATTT3'
11	5' AAATG <b>CATG</b> CAAAATTTTCAACAATTTTAAATTATATTT3' 5' CCGGAAATATAATTTAAATTTGTTGAAAAATTT <b>GCATG</b> CATTT3'
12	5' AAATGTATTTAAAG <b>CATG</b> CAACAATTTTAAATTATATTT3' 5' CCGGAAATATAATTTAAATTTGTTG <b>CATG</b> CTTTTAAATACATTT3'
13	5' AAATGTATT <b>AGTGCATGCT</b> CAAT <b>CAAGCACT</b> AATTATATTT3' 5' CCGGAAATATAATT <b>AGTGCTTGATTGAGCATGCACT</b> AATACATTT3'
14	5' AAAT <b>GCG</b> TATTTAAATTTTCAACAATTTTAAATTAT <b>CGC</b> TATTT3' 5' CCGGAAATA <b>GCG</b> TAATTTAAATTTGTTGAAAAATTTAAATAC <b>CCG</b> CATTT3'
15	5' AAATGTATTTA ( <b>AAA</b> ) TTTTCAACAATT ( <b>TTT</b> ) AAATTATATTT3' 5' CCGGAAATATAATTT ( <b>AAA</b> ) AATTGTTGAAAA ( <b>TTT</b> ) TAAATACATTT3'
16	5' AAATG <b>ATCCCTCGAGGGGAT</b> CATTT3' 5' CCGGAAATG <b>ATCCCTCGAGGGGAT</b> CATTT3'
17	5' <b>TTT</b> AGTATTTAAATTTTCAACAATTTTAAATTAT <b>TAAA</b> 3' 5' CCGG <b>TTTA</b> AATAATTTAAATTTGTTGAAAAATTTAAATAC <b>TAAA</b> 3'
18	5' ( <b>AA</b> ) ATGTATTTAAATTTTCAACAATTTTAAATTATATTT3' 5' CCGGAAATATAATTTAAATTTGTTGAAAAATTTAAATACAT ( <b>TT</b> ) 3'
19	5' <b>TCGGG</b> AAATGTATTTAAATTTTCAACAATTTTAAATTATATTT3' 5' CCGGAAATATAATTTAAATTTGTTGAAAAATTTAAATACATTT <b>CCGGA</b> 3'
20	5' <b>AAGAACA</b> AATGTATTTAAATTTTCAACAATTTTAAATTATATTT3' 5' CCGGAAATATAATTTAAATTTGTTGAAAAATTTAAATACATTT <b>GTTCTT</b> 3'
23	5' <b>C</b> AAATGTATTTAAATTTTCAACAATTTTAAATTATATTT3' 5' CCGGAAATATAATTTAAATTTGTTGAAAAATTTAAATACATTT <b>G</b> 3'
24	5' <b>AGCC</b> AAATGTATTTAAATTTTCAACAATTTTAAATTATATTT3' 5' CCGGAAATATAATTTAAATTTGTTGAAAAATTTAAATAATTT <b>GGCT</b> 3'
25	5' <b>AGAAGAACA</b> AATGTATTTAAATTTTCAACAATTTTAAATTATATTT3' 5' CCGGAAATATAATTTAAATTTGTTGAAAAATTTAAATACATTT <b>GTTCTTCT</b> 3'

Tabla M1. Pares de oligonucleótidos con las modificaciones realizadas en la primera estructura en horquilla de la 5'UTR. En cada pareja de oligonucleótidos se ha marcado en rojo los cambios realizados con respecto a la secuencia silvestre del gen, en verde los nucleótidos añadidos al extremo 5' de la secuencia silvestre, en azul los que se han eliminado, en rosa los que se han añadido internamente en la secuencia y en morado la secuencia que ha sido invertida.

### 1.2 Modificaciones en la segunda estructura secundaria de la 5' UTR.

Con objeto de poder modificar la segunda estructura secundaria de la 5'UTR se empleó el plásmido +157 (figura M.1) para realizar sobre él una mutagénesis dirigida. Se utilizó el kit QuickChange Site-Directed Mutagénesis (Stratagene) según las instrucciones del fabricante, para generar una diana de restricción para *Eco47III* en la posición +91 de la 5'UTR (ATG GTT → **AGC GCT**) con los siguientes oligonucleótidos complementarios:

**SP6 5' → 5' CATTATTTATATAAA**AGC**GCTCCACAAACAGAACT 3'**

**SP6 3' → 5' AGTTTCTGTTTGTGGAG**CGC**TTTATATAAATAAATG 3'**

La mutagénesis se llevó a cabo mediante 16 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 94° C, 1 minuto a 53° C y 12 minutos de síntesis a 68° C, precedidos por 1 minuto de desnaturalización a 94° C.

Se emplearon oligonucleótidos complementarios (Isogen Life Science) que sustitúan el fragmento de la 5'UTR comprendido entre las posiciones +39 y +91 de la 5'UTR y regeneraban los sitios de reconocimiento de *BspEI* y *Eco47III*.

Los oligonucleótidos empleados para estas clonaciones se especifican en la tabla M.2:

Nombre	Oligonucleótidos
<b>21</b>	5' CCGGACT <b>AGCATGCAATTACGA</b> TGTCAAAAGAAGTTACATTTATTATATAAAGC3' 5' GCTTTATATAATAAATGTAACCTCTTTTGACTTCGTAATTGCATGCTTGT3'
<b>22</b>	5' CCGGAC <b>ACGCATGCAATTTGCG</b> GTCAAAGAAGTTACATTTATTATATAAAGC3' 5' GCTTTATATAATAAATGTAACCTCTTTTGACCGCAAATTGCATGCGTGT3'

Tabla M.2. Parejas de oligonucleótidos con las modificaciones realizadas en la segunda estructura en horquilla de la 5' UTR. Detalles en la tabla M.1.

### 1.3 Determinación de las estructuras secundarias de la 5' UTR.

La estructura nativa del extremo 5' del transcrito del gen *rbcL* de *C. reinhardtii* se determinó en un trabajo previo mediante el método de alquilación con DMS (Anthonisen *et al.*, 2001). La estructura determinada experimentalmente es idéntica a la estructura predicha por la versión 3.0 del programa m-fold (Zuker, 2003). Las estructuras secundarias mostradas en este

trabajo son las estructuras que se predicen por el servidor del programa m-fold en la página del Burnet Institute (<http://mfold.burnet.edu.au/>) utilizando una temperatura de 32° C. En todos los casos, excepto para las construcciones **4** y **20**, se obtuvo sólo un plegamiento para la 5'UTR con el algoritmo resultante del programa m-fold. Para las construcciones **4** y **20** se han usado los plegamientos resultantes más probables, aquellos con menor energía libre.

#### 1.4 Clonación de las modificaciones de la 5'UTR en pBlueScript.

Se diseñaron parejas de oligonucleótidos complementarios desde +1 hasta +41 con las distintas modificaciones a analizar y se clonaron en el plásmido +157 (figura M.1). Se hibridaron las distintas parejas de oligonucleótidos en 50 µl, a una concentración final de 12.5 µM y a temperatura ambiente, durante 15 minutos previamente desnaturalizadas durante 2 minutos a 100° C en un baño seco. Posteriormente se fosforilaron los extremos 5' de las parejas con la enzima PNK (Fermentas) en el tampón comercial correspondiente, a 37° C durante 1 h. Se purificaron las parejas de oligonucleótidos en un gel de agarosa al 1.3% seguido de una columna de afinidad (GFX PCR DNA and Gel Purification kit, Amersham Biosciences) según el manual del producto. Se cuantificó la concentración de oligonucleótidos recuperada mediante fluorescencia con un sistema DyNAQuant 200 (Hoefer).

Para la clonación de las modificaciones de la primera horquilla se preparó el plásmido +157 digiriéndolo con *SwaI* y *BspEI* (New England Biolabs) o se digirió el plásmido +157 con *BspEI* y *Eco47III* para las modificaciones de la segunda parte de la 5'UTR. Se purificaron en un gel de agarosa al 1% y con el kit anteriormente descrito. La ligación se llevó a cabo con la DNA-Ligasa T4 (3u/µl) (Promega) durante 4 horas a 16° C y 30 minutos a temperatura ambiente.

#### 1.5 Clonación de las modificaciones en el vector de transformación cloroplástica.

Cada modificación realizada sobre el plásmido +157, **+157\***, se digirió con *XhoI* y *XbaI* y este inserto se clonó en el vector de transformación del cloroplasto de *C. reinhardtii* **pCrc32**, derivado de pUC18, (Blowers *et al.*, 1993a) previamente digerido con *XhoI* y *XbaI*. En todos los casos los fragmentos resultantes de la digestión se purificaron como se describe en el apartado anterior. Esta construcción final presentará el gen quimérico completo ya que pCrc32 aporta

la 3'UTR de *psbA*, conteniendo las secuencias mínimas necesarias para expresarse en el cloroplasto. Además el gen quimérico queda flanqueado por dos regiones cloroplásticas de  $\approx 2$  Kb que dirigirán su inserción mediante recombinación homóloga entre parte del gen *atpB* y la región IR. La inserción de este fragmento en el genoma cloroplástico complementa la mutación del gen *atpB* en el mutante CC-373 (figura M.2)(Blowers *et al.*, 1989). La ligación se realizó como se ha descrito previamente.

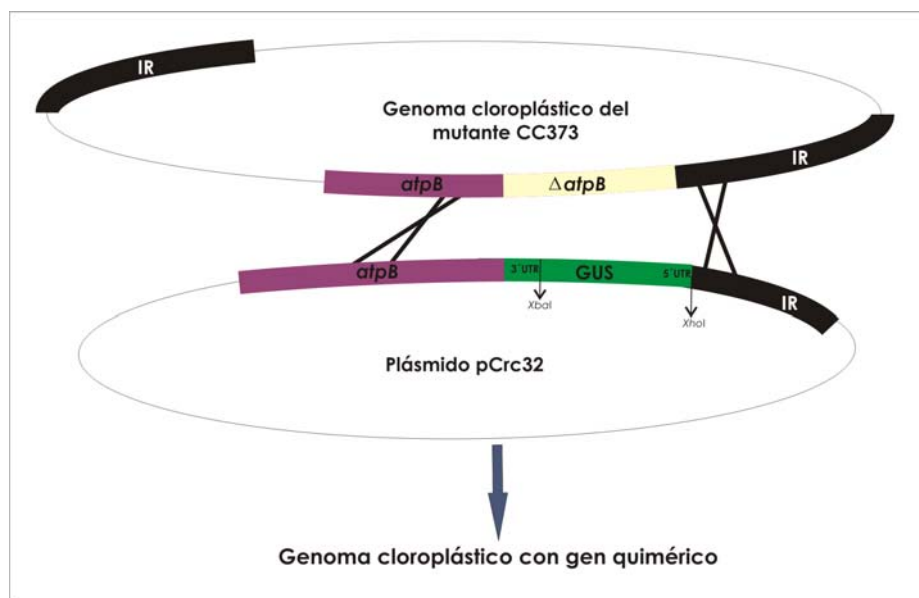


Figura M.2. Recombinación homóloga del vector de transformación pCrc32 y el genoma cloroplástico de CC-373.

## 1.6 Análisis de las clonaciones realizadas.

### 1.6.a. Transformación de *Escherichia coli*.

En todos los casos los plásmidos obtenidos, +157\* y pCrc32\*, se clonaron en *Escherichia coli* (TB1) para su mantenimiento, manipulación y almacenaje. Se empleó el método de  $\text{CaCl}_2$  (sección 1.8.1. de Ausube *et al.*, 1995) para hacer a las células competentes para la transformación. Las células se incubaron con el plásmido durante 30 minutos en hielo y a continuación se sometieron a un choque térmico (90 segundos a  $42^\circ\text{C}$ ) y, tras dejar recuperar las células 5



minutos en hielo, se crecieron durante una hora en medio de cultivo LB (sección 1.1.2 de Ausube *et al.*, 1995) a 37° C y en rotación. Se plaquearon en un medio de LBA (ampicilina a concentración final de 50 µg/ml) y se crecieron durante toda la noche a 37° C en la estufa. Las células transformantes se mantuvieron en forma de glicerizados (glicerol al 12.5%) a -80° C.

#### 2.6.b. Extracción de DNA plasmídico.

Después de cada ligación se hizo un rastreo de transformantes positivos realizando una extracción de DNA plasmídico a pequeña escala. Puesto que todas las clonaciones se realizaron sobre un plásmido con un inserto, sobre +157, no se pudo utilizar la selección mediante *lacZ* que presentan los plásmidos comerciales empleados. El rastreo se realizó mediante análisis de restricción de DNA plasmídico a partir de 1.5 ml de cultivo mediante el método por lisis alcalina (sección 1.6.1 de Ausube *et al.*, 1995). La comprobación se llevó a cabo utilizando las enzimas de restricción *SwaI* y/o *BspEI*, *XbaI* y/o *XhoI* y, en algunos casos, algunas enzimas de restricción con dianas introducidas en la modificación. De cada construcción se realizó una extracción de DNA plasmídico preparativa. Estas extracciones se realizaron partiendo de cultivos de 50 ml de LBA. Se empleó el método extracción de lisis alcalina seguido de una purificación mediante gradiente de CsCl (sección 1.7.6 de Ausube *et al.*, 1995) o, alternativamente, se empleó un kit de extracción de DNA plasmídico a gran escala (Perfectprep Plasmid Maxi, Eppendorf) según las instrucciones de la casa comercial. En todos los casos, se cuantificó el DNA midiendo la absorbancia a 260 nm. Las construcciones finales, en pCrc32, se secuenciaron en el Servei de Seqüenciació de la Universitat de València (S.C.S.I.E), previamente a la transformación de *C. reinhardtii*.

## 2. Transformación del cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii* por biolística.

### 2.1 Preparación del mutante CC-373.

Se emplearon cultivos del mutante CC-373 crecidos como se describe en el apartado 1. Se recogieron las células de 500 ml de cultivo (2500g, 5 minutos) y se resuspendieron en 500 µl de HSHA. Se diluyeron 4 veces con medio HSHA 0.01% Bacto-agar en un bloque seco a 42° C y se extendieron sobre medio HSHA-agar en placas petri de 5.2 cm de diámetro formando un fino lecho de células. Estas

células se guardaron a temperatura ambiente y en oscuridad, al menos durante 4 horas, hasta el momento de disparar con el fin de secar el medio con baja concentración de agar.

## 2.2 Preparación de los microproyectiles.

La transformación del cloroplasto de *C. reinhardtii* se realizó mediante bombardeo de microproyectiles de oro de 0.6  $\mu\text{m}$  de diámetro (Microcarrier 0.6 Micron Gold, Bio-Rad). Se esterilizaron 30 mg de proyectiles lavándolos 3 veces con 500  $\mu\text{l}$  de etanol absoluto (1000 g, 1 minuto) y dejándolos finalmente resuspendidos en 500  $\mu\text{l}$  de etanol absoluto.

## 2.3 Biolística.

Cada plásmido pCrc32\* se precipitó sobre los microproyectiles. A 50  $\mu\text{l}$  de suspensión de microproyectiles estériles se añadió, en este orden y en continua agitación, 5  $\mu\text{g}$  de DNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{CaCl}_2$  2.5 M y 20  $\mu\text{l}$  de espermidina 0.1M. La mezcla se agitó 3 minutos y, a continuación, se lavó dos veces con 250  $\mu\text{l}$  de etanol 100% (1000 g, 10 segundos). Finalmente se resuspendieron en 50  $\mu\text{l}$  de etanol 100%. Se utilizaron 10  $\mu\text{l}$  de proyectiles por disparo y placa. Se realizaron 3 réplicas por construcción.

Se utilizó el sistema de bombardeo PDS-1000/He (Bio-Rad) con discos de ruptura (Ruptura disc 1350 psi, Bio-Rad) fijando la presión de la bala de He a 1550 psi. Las placas de transformación se colocaron a una distancia fija de 12 cm entre el macrosoporte que contiene los microproyectiles y las células.

## 2.4 Selección de los transformantes fotosintéticos.

Tras los disparos se guardaron las placas a temperatura ambiente y en oscuridad. 24 horas después, se recogieron las células de las placas de transformación con 400  $\mu\text{l}$  de medio HS y se pasaron a placas de medio HS agar. Se colocaron las placas a temperatura ambiente inicialmente bajo luz de intensidad baja ( $\approx 0.05 \mu\text{mol/s m}^2$ ) y paulatinamente se fue aumentando esta intensidad ( $\approx 50 \mu\text{mol/s m}^2$ ). Al cabo de 2-4 semanas aparecieron colonias de células transformantes que se recuperaron pasándolas a nuevas placas de medio sólido HS.

### 3. Análisis de transformantes fotosintéticos.

#### 3.1 Extracción de DNA de *Chlamydomonas reinhardtii*.

Se partió de 35 ml de cultivo de células de *C. reinhardtii* de una densidad de  $2.5 \times 10^6$  células/ml. Se recogieron las células por centrifugación (2500 g, 5 minutos). Se resuspendieron en 750  $\mu$ l de tampón de extracción (Tris-HCl 100 mM pH 8, EDTA 50 mM, NaCl 0.5 M,  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM). Se añadieron 50  $\mu$ l de SDS 21% y se incubaron a 65° C durante 15 minutos. Tras la lisis se dejó enfriar a temperatura ambiente y se añadieron 750  $\mu$ l de fenol saturado a pH 7. Se lavó con fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) dos veces y una última con cloroformo:isoamílico (24:1). La fase acuosa se precipitó con igual volumen de isopropanol a temperatura ambiente. Se recogieron los ácidos nucleicos centrifugando a baja velocidad (1200 g, 5 minutos) y se resuspendieron en 90  $\mu$ l de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM). Se digirió el RNA con 10  $\mu$ g de RNasa (1 mg/ml) durante 1 hora a 37° C. El DNA se precipitó con NaAc 0.3 M y dos volúmenes de etanol al 96%. Se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 20  $\mu$ l de agua estéril. El DNA genómico se cuantificó utilizando fluorometría con un sistema DyNA Quant 200 (Hoefer).

#### 3.2 Extracción de RNA de *Chlamydomonas reinhardtii*.

Se partió de 35 ml de cultivo de células de una densidad aproximada de  $2.5 \times 10^6$  células/ml. Se tomaron muestras a 11 horas de oscuridad y a 1 hora de encenderse la luz. La extracción de la muestra de oscuridad se mantuvo en oscuridad hasta que se inició la lisis celular. Se recogieron las células por centrifugación, y se resuspendieron en 1.5 ml de tampón de extracción de RNA (Tris-HCl 200 mM pH 8, EDTA 10 mM, NaCl 0.6 M, SDS 1.2%), se adicionaron 150  $\mu$ l de inhibidor de RNAsas 200 mM (Vanadil Ribonucleosid, New England Biolabs) y se añadieron 2 ml de fenol, equilibrado a pH 8, precalentado a 65° C. Se incubó a 65° C durante 15 minutos. Se homogeneizó la mezcla cada cierto tiempo para evitar la separación en dos fases. Después de atemperar la muestra se añadió 1 ml de cloroformo:isoamílico (24:1), se homogeneizó y se centrifugó (6000g, 5 minutos). Se realizó un lavado más con fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) y uno final con cloroformo:isoamílico (24:1). Los ácidos nucleicos se precipitaron con isopropanol y NaAc 0.3M durante 3 horas a -20° C. Se centrifugó (17000g, 15 minutos) y, tras lavar con etanol al 70% la muestra, se

resuspendió en 300 µl de agua con DEPC (0.1%). Se procedió a precipitar selectivamente el RNA incubando la muestra 2 horas en hielo con LiCl 2M. Se recogió el RNA (12000 g, 15 minutos) y el sedimento se resuspendió en 100 µl de agua con DEPC (0.1%), utilizando 10 µl para cuantificar en el espectrofotómetro. El resto de la muestra se precipitó y se resuspendió en todos los casos a una concentración final de 2 µg/µl.

#### 4. Detección de ácidos nucleicos:

##### 4.1 Sondas radiactivas de GUS y *atpB*.

El molde de la sonda de GUS corresponde al gen *uidA* (GUS), 1.9 Kb, clonado en el vector pBI221 y liberado de éste digiriéndolo con *SacI* y *XbaI*. El molde de la sonda de *atpB* es un fragmento de 700 pb de la región codificante del gen, clonado en pUC7 con *EcoRV* y *HpaI*. El fragmento de la sonda se liberó del vector mediante digestión con *EcoRI*.

Las sondas se marcaron radiactivamente. Se desnaturalizaron 120 ng de DNA molde en 12.5 µl de agua (95° C, 2 minutos). A la reacción se adicionaron 2 µl de dNTPs (ATP, GTP y TTP 20 mM) y 2.5 µl de dCTP [ $\alpha^{32}$ P], 1 unidad de fragmento Klenow de la RNA polimerasa I (Roche) y hexanucleótidos al azar (Hexanucleotides Buffer 10X, Roche) como cebadores. La mezcla se incubó a 37° C durante 3 horas.

##### 4.2 Hibridación.

Tanto la prehibridación como la hibridación se llevaron a cabo en tubos de cristal a 65° C y en constante rotación, en la solución de hibridación D (tampón fosfato sódico 0.5M, EDTA 1 mM, BSA 1% y SDS 7%). La hibridación de las membranas se llevó a cabo con 1.5 ml de tampón de hibridación D y 0.75 µl de sonda por cm<sup>2</sup> de membrana. La sonda se desnaturalizó previamente a 100°C durante 5 minutos. Se eliminaron los restos de sonda radiactiva unida de forma inespecífica lavando 2 veces 5 minutos, con tampón de lavado D1 (tampón fosfato sódico 40 mM, EDTA 1mM y SDS 5%) y 6 lavados de 5 minutos y uno final de 20 minutos con tampón de lavado D2 (tampón fosfato sódico 40 mM, EDTA 1mM y SDS 1%). Todos los lavados se llevaron a cabo a 65° C. La membrana se expuso, normalmente durante una noche a -80° C, a una película de autorradiografía, BioMax MS Film, KODAK, en un casete preparado para este fin (Hypercassette™ Amersham Bioscience).

#### 4.2.a. Slot blot.

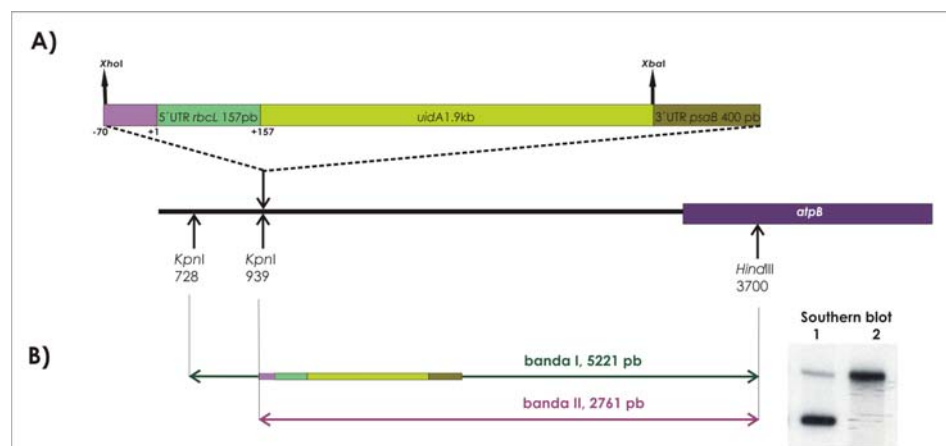
Se desnaturalizó 1 µg de DNA de los transformantes con 3 µl de NaOH en un volumen final de 50 µl a 65° C durante 45 min. Se montó el sistema Bio-Dot® SF (Bio-Rad) con una membrana de nylon cargada positivamente (Zeta-probe membrane blotting, Bio-Rad) equilibrada con SSC 10X. Cada ranura se lavó con 200 µl de SSC 10X, y a continuación se pasó el DNA desnaturalizado en SSC 10X en un volumen final de 100 µl. Finalmente se lavó con 200 µl de SSC 10X. Se entrecruzó el DNA a la membrana por exposición a radiación UV de 30 mJ, GS Gene Linker Chamber (Bio-Rad).

#### 4.2.b. Southern blot.

Sólo se analizaron por Southern blot aquellos transformantes que dieron positivo en la hibridación de la membrana del Slot blot. Se digirió 1 µg de DNA de los transformantes positivos con 5 unidades de *KpnI* y *HindIII* (Roche) a 37° C durante 1 hora y 30 minutos. Se aumentó el volumen final para añadir 5 unidades más de enzimas y se incubó nuevamente. El producto de la digestión se separó en un gel de agarosa al 1%. Las muestras se transfirieron por capilaridad con un sistema húmedo como el que se describe en la sección 2.9.1 de Ausube *et al.*, 1995) empleando como tampón de transferencia NaOH 0,4M o, alternativamente, SSC 10X durante más de 12 horas a una membrana de nylon (Zeta-probe membrane blotting, Bio-Rad). Se fijó el DNA a la membrana mediante radiación con luz UV.

El cloroplasto presenta un número variable, 50 a 80, de copias de su genoma. Mediante la transformación por biolística el gen heterólogo introducido puede insertarse en mayor o menor número de genomas. Se dice que el cloroplasto es homoplásmico para un gen cuando éste está presente en todas las copias genómicas. En el caso de *C. reinhardtii*, por extensión, se habla de células transformantes homoplásmicas o heteroplásmicas para un gen, ya que sólo posee un cloroplasto. Para el estudio se escogieron aquellos transformantes fotosintéticos que presenten, al menos, en el 80% de los genomas el gen quimérico. Este análisis se utilizó para determinar el grado de homoplasmicidad de los transformantes. Empleando una sonda correspondiente a la zona de inserción del transgen (gen *atpB*) se pueden detectar dos bandas de distinto tamaño, según se haya insertado el transgen o

no en un genoma (figura M.3). La banda inferior corresponde a los genomas sin inserto. Ese fragmento resultante de la digestión presenta un tamaño molecular de 2.761 Kb (Banda 1). La banda 2, de 5.16 Kb, contiene el gen quimérico. El transformante será más homoplásmico cuanto más enriquecida esté la banda superior en proporción con la inferior. El tamaño de las bandas marcadas específicamente en la hibridación se determinó utilizando el marcador de pesos moleculares (1 Kb Plus DNA Ladder, Roche).



**Figura M.3. Inserción del transgen en el genoma cloroplástico de *C. reinhardtii*.** A) Esquema de la recombinación homóloga en el genoma de *C. reinhardtii*. B) Fragmentos de restricción obtenidos en el Southern blot y bandas obtenidas tras la hibridación con la sonda específica.

## 6. Northern blot y molde de la sonda GUS.

El RNA se separó en un gel de agarosa al 1.2% utilizando como tampón de electroforesis MOPS al 1X con formaldehído 2.2 M. Las muestras, 6 µg de RNA, se prepararon con formaldehído 2.2 M, tampón MOPS al 1X, bromuro de etidio a concentración final de 20 µg/ml y formamida al 50%. Tras incubar las muestras 15 minutos a 65° C y 5 minutos en hielo se cargaron en el gel con tampón de carga 1X (50% glicerol, 1 mM EDTA, 0.25% azul de bromofenol y 0.25% de xilencianol. Toda el agua utilizada para el gel de RNA fue tratada con DEPC (0.1%). La electroforesis se desarrolló durante 3 horas a 60 V.

Se transfirió el RNA del gel a una membrana de nylon como la empleada en la transferencia de DNA. Se empleó un sistema de transferencia húmedo con SSC 10 X ó NaOH 50 mM. En el primer caso, la transferencia tuvo lugar durante toda la noche y, en el segundo, durante al menos 4 horas. Independientemente del tampón empleado, se inmovilizó el RNA a la membrana irradiándola con luz UV. La hibridación se llevó a cabo como se describe en el apartado M5.2.

## 7. Determinación de la velocidad de transcripción *in vivo*.

Las células se crecieron en un medio HS con baja concentración de fosfato (medio I: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.005 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.005 g/l y HEPES 10mM) en fotoperíodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad, al menos durante 3 días. Se recogieron (2000g, 5 minutos) 4x10<sup>8</sup> células al final del período de oscuridad y se resuspendieron en 20 ml de medio II (idéntico al medio I pero sin fosfato). Tras 5 minutos en agitación en un erlenmeyer de 250 ml se adicionaron 800 µCi α<sup>32</sup>P (tiempo 0). El cultivo se mantuvo en oscuridad y agitación. Se tomaron dos muestras sucesivas a los 10-15 y 20-30 minutos, respectivamente. Cada muestra se diluyó con 20 ml de medio HS frío y se recogieron las células (4000g, 5 minutos a 4° C) para proceder a una extracción de RNA total, como en el apartado 5.2. Para estimar la velocidad de incorporación del fosfato radiactivo se realizó un Slot blot, como se describe en el apartado 5.2.a, con 1 µg de distintas sondas específicas (*uidA*, *rbcl*, *atpB* y pUC18). Cada sonda se hibridó, respectivamente, con 10 µg de RNA total de cada muestra. La cantidad de cada sonda empleada supone un exceso respecto al RNA específico en las muestras. La hibridación se realizó durante 72h a 65° C como se describe en el apartado de 5.3. Las tasas específicas de transcripción se cuantificaron por análisis de imagen con el programa 1-D (Kodak Digital Science, Rochester, N.Y.) y la señal del transcrito quimérico se normalizó con la señal del gen endógeno *rbcl* y teniendo en cuenta la longitud de cada gen.

## 8. Rastreo de factores *trans in vivo* con unión a la 5'UTR mediante retardo en gel y MS/MS.

### 8.1 Construcción del gen quimérico para el ensayo de retardo de movilidad electroforética.

Para el ensayo de retardo en gel se requiere un transcrito menor de 400 nt, para lo que se creó un nuevo gen quimérico, GUS146 (figura M.4). Para su construcción se realizó una PCR utilizando de molde el plásmido MU7 (Salvador *et al.*, 1993a) que contiene 160 pb del promotor y la 5'UTR del gen *rbcl* y el gen *uidA* clonado en pauta de lectura.

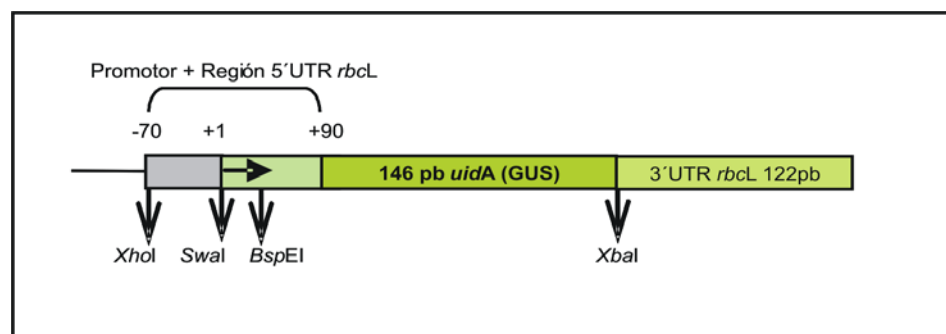


Figura M.4. Esquema de la construcción GUS146 para el ensayo de retardo en gel *in vivo*. El transcrito resultante contiene, aproximadamente, 350 ribonucleótidos de longitud.

Los oligonucleótidos empleados para la PCR fueron:

**GUS146-5' → 5' TCTATGCTCGAGTGATAA3'**

Este oligonucleótido hibrida desde la posición 1021 del gen *rbcl* y en esa posición hay una diana de restricción para *XhoI*.

**GUS146-3' → 5' CCGGCTTTCTTCTAGAGCGCTTTC3'**

Este oligonucleótido hibrida desde la posición 146 del gen *uidA* y en el se introdujo un sitio de restricción para *XbaI* (TGTAAC → TCTAGA).

La amplificación se llevó a cabo mediante 30 ciclos de 1 minuto de desnaturalización a 94° C, 1 minuto de unión de los oligonucleótidos a 55° C y 1 minuto de extensión a 72° C, precedidos por 5 minutos de desnaturalización a 94° C y seguidos de un tiempo de extensión final a 72° C. Se empleó para la



reacción 100 ng de DNA de MU7, 1.5 unidades de Taq polimerasa (EcoTaq DNA polymerasa, Ecogen) con tampón comercial 1X, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, dNTPs 1 mM. El fragmento de 308 pb obtenido se purificó de un gel de agarosa al 1.5% seguido de una columna de purificación (GFX PCR DNA and Gel Purification kit, Amersham Biosciences). Se cuantificó la concentración del producto de PCR recuperado mediante fluorescencia con un sistema DyNAQuant 200 (Hoefer). Se clonó en un plásmido comercial Qiagen PCR Cloning Kit siguiendo el manual de instrucciones y empleando células competentes preparadas en el laboratorio y el protocolo de transformación anteriormente descrito. Este plásmido clonado se denominó pDrive7-146. A partir de este punto se trató el plásmido como el de las construcciones +157\*. La clonación final para la transformación del cloroplasto se realizó, en este caso, en otro vector de transformación de *C. reinhardtii*, pCrc34, semejante al plásmido anteriormente descrito pero con la 3'UTR de *rbcl*, que es de menor longitud que la de *psaB*.

Se introdujo de forma estable en el genoma cloroplástico y se seleccionó un transformante homoplásmico. Se comprobó la estabilidad del transcrito de estudio mediante una extracción de RNA y un Northern blot como el anteriormente descrito. Este RNA se empleó como control del tamaño del RNA libre en los ensayos de retardo en gel.

Para la obtención de los complejos *in vivo* se ha adaptado a *C. reinhardtii* el protocolo descrito en (Daros y Flores, 2002):

## 8.2 Irradiación de las células con luz UV.

Se partió de  $3.6 \times 10^8$  de células, de la cepa silvestre y del transformante GUS146, crecidas en condiciones fotoautotróficas y tomadas al final del período de oscuridad, trabajando en estas condiciones hasta la lisis celular. Las células se recogieron (2500 g, 5 minutos) y se resuspendieron en 3 ml de medio HS. Se colocaron en una placa Petri de cristal de 5 cm de diámetro sobre un lecho de hielo. Las células se irradiaron durante 15 minutos con luz UV de 254 nm máxima y una energía de 318 mJ a una distancia de 10 cm desde la fuente de irradiación (GS Gene Linker UV Chamber, BIO-RAD).

Se recogieron las células (2500 g, 5 minutos) y se resuspendieron en 3 ml de tampón A (Tris-HCl 0.1 M pH 9.0, 2-βmercaptoetanol 0.1 M, EDTA 10 mM, urea 5 M y NaCl 0.1 M). Todas las soluciones que contenían urea fueron preparadas en el momento de uso.

### 8.3 Lisis celular y obtención de aductos.

Se rompieron las células mediante sonicación empleando una punta de 3,7 mm de diámetro (Vibra Cell, Sonics & Materials). Se sonicó en hielo hasta comprobar que todas las células estaban rotas. Se clarificaron los extractos por centrifugación (12000 g, 15 minutos). Se calculó el volumen de extracto obtenido para llevar las soluciones a una concentración de urea 8 M y NaCl 1 M en un volumen final de 4-4,5 ml. A partir de este punto se trabajó siempre a 10° C o a temperatura ambiente para evitar la precipitación de la urea. Se mantuvo en agitación aproximadamente 1 hora para asegurar la completa disolución de la urea y la sal. Se centrifugó (12000 g, 30 minutos a 10° C) para recoger los grandes complejos proteicos que han precipitado al llevarlo a NaCl 1 M. El extracto se filtró a través de nylon con un tamaño de poro de 54 µm.

Se recogió el sobrenadante y se fenolizó usando el mismo volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) equilibrado a pH 8.5. Se agitó la mezcla durante 5 minutos y se separaron las fases por centrifugación (12000 g, 15 minutos). Se eliminó la fase acuosa y la fase orgánica, dejando exclusivamente la interfase en el tubo. Ésta se resuspendió exhaustivamente con 3 ml de tampón B (tampón A con 8 M urea y 1 M NaCl). La fenolización se repitió dos veces más del mismo modo. Si la interfase era muy grande y arrastraba mucho fenol se realizó un lavado final con cloroformo:isoamílico (24:1). Finalmente se resuspendió la interfase en 3 ml de tampón B y se precipitó con, al menos, 1 volumen de isopropanol durante toda la noche a 4° C. El precipitado se recogió (12000 g, 30 minutos a 10° C) y se trató como un sedimento de ácidos nucleicos. Se resuspendió en 100 µl de tampón  $\theta$  (Tris-HCl 25 mM pH 9, NaCl 25 mM, EDTA 1 mM, 2- $\beta$ mercaptoetanol 10 mM y urea 8M) vigorosamente con el vortex ya que es bastante insoluble.

Se emplearon columnas comerciales de afinidad de ácidos nucleicos (Tip-20, Qiagen) para enriquecer la muestra en complejos de RNA y eliminar los complejos de DNA-proteínas y los grandes complejos proteicos arrastrados con la interfase. La columna se equilibró con 2 ml de tampón  $\theta$  (Tris-HCl 0.1 M pH 7, NaCl 0.25 M, urea 8 M, EDTA 10 mM, 2- $\beta$ mercaptoetanol 0.1 M, Nonidet P-40 1%). La muestra, homogeneizada con 400 µl de tampón  $\theta$ , se aplicó y se lavó con 6 ml de tampón  $\theta$ . La muestra se eluyó con 2 ml de tampón (Tris-HCl 0.1 M, pH 9, NaCl 1.5 M, urea 8 M). La muestra purificada se precipitó durante toda la noche

a 4° C con 1 volumen de isopropanol y NaAc 0.3M y 15 µl de Glycoblue (Ambion). El precipitado se recogió centrifugando (12000 g, 15 minutos) y se trató como un sedimento de ácidos nucleicos, resuspendiéndolo finalmente en 50 µl de tampón  $\theta$  o, alternativamente, directamente en el tampón de carga en el gel.

#### **8.4 Análisis de los complejos RNA-proteínas.**

##### **8.4.a. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes.**

La fracción rica en complejos se separó en un gel PAGE 5% urea 8M en TBE al 1X. Como tampón de carga se empleó formamida al 94.5%, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, 0.025% azul bromofenol y 0.025% xilencianol. La electroforesis se desarrolló a voltaje constante, 200 V, durante 4 horas. Posteriormente se tiñó con bromuro de etidio para su visualización con luz UV.

##### **8.4.b. Northern blot.**

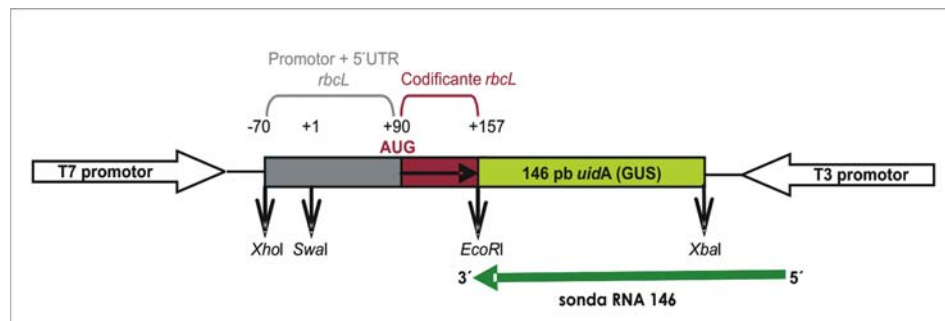
Las muestras se transfirieron a una membrana de nylon neutra (Hybond-N, Amersham Biosciences) utilizando un sistema de electrotransferencia (Milliblot-SDE System, Millipore). El tampón de electrotransferencia usado es Tris 25 mM/ Glicina 192 mM y la transferencia se llevó a cabo a amperaje constante por cm<sup>2</sup> de membrana. Los ácidos nucleicos se fijaron a la membrana por radiación con luz UV.

La prehibridación y la hibridación se llevaron a cabo a 65° C con tampón de hibridación R (formamida 50%, SSC 0.25X, Ficoll 1%, PVP 1% y SDS 10%). La sonda empleada en la hibridación se describe a continuación. La membrana se lavó, tras la hibridación durante al menos 12 horas, 3 veces con tampón de lavado R1 (SSC 2X y SDS 0.1%) durante 20 minutos a temperatura ambiente y 1 vez con tampón de lavado R2 (SSC 0.1X y SDS 0.1%) a 55° C. La membrana se expuso a una autorradiografía como se describe en el apartado 5.2.a.

##### **8.4.c. Sonda RNA146.**

Como sonda se utilizó el RNA antisentido de los primeros 146 nucleótidos de la ORF del gen *uidA*. Se clonó en pBlueScript un fragmento amplificado por PCR utilizando como molde el plásmido MU31, que difiere de MU7 por contener los primeros 157 nucleótidos del gen *rbcl*. Sobre este molde se llevó a cabo una amplificación con los cebadores descritos en el apartado 7.1 y en las mismas

condiciones. El amplificado se clonó tras digerir el fragmento amplificado y el plásmido con *Xho*I y *Xba*I. Se obtuvo el RNA antisentido marcado radiactivamente con  $\alpha^{32}\text{P}$  por transcripción *in vitro* linearizando el plásmido con *Eco*RI (figura M.5).



**Figura M.5.** Esquema del vector de la transcripción de la sonda RNA146. La sonda es la cadena RNA- de la secuencia de 146 nt de GUS del transcrito.

La reacción de marcaje se llevó a cabo empleando 3-5  $\mu\text{l}$  de  $[\alpha^{32}\text{P}]$  TTP (800 Ci/mmol), MP Biomedicals, 1  $\mu\text{l}$  de RNA polimerasa T3 (MEGAscript High Yield Transcription Kit, Ambion) 1  $\mu\text{l}$  de inhibidor de RNAsa (Roche) y tampón de reacción 1X (ATP, CTP y GTP 2 mM, Tris-HCl 160 mM pH 8,  $\text{MgCl}_2$  24 mM, DTT 40 mM, espermidina 8 mM) incubándolo durante 2 horas a 37° C. La sonda se purificó usando una columna de exclusión molecular Sephadex G-50 (Mini Quick Spin Columns, Qiagen) siguiendo las instrucciones del manual del producto. La sonda se cuantificó en un contador de centelleo líquido empleando 2  $\mu\text{l}$  de la misma contando las cpm en 5 ml de líquido de centelleo (Cocktail 22 for liquid scintillation, Formascint, Scharlau). En la hibridación se emplearon de  $1\text{-}5 \times 10^6$  de cpm en 5 ml de tampón de hibridación-RNA.

#### 8.4.d. Digestión con proteinasa K.

La muestra de complejos RNA-proteínas se mezcló con 20  $\mu\text{g}$  de proteinasaK en 100  $\mu\text{l}$  de tampón de digestión (Tris-HCl pH 8 10 mM, EDTA 5 mM y 2- $\beta$ -mercaptoetanol 1mM y SDS 0.5 %). Se incubó a 42° C 30 minutos y a continuación a 55° C otros 30 min. El RNA se recuperó precipitando con 2

volúmenes de etanol 96% y NaAc 0.3 M. La muestra se precipitó, se lavó y se secó como si se tratara de una muestra de ácidos nucleicos. Se resuspendió en 50 µl de tampón  $\theta$  ó, alternativamente, directamente en el tampón de carga de gel.

#### 8.4.e. Análisis de las proteínas por MS/MS.

Se llevó a cabo una electroforesis preparativa en gel desnaturalizante según las condiciones señaladas en el apartado 7.3. Como material de partida se utilizaron  $4.3 \times 10^9$  de células por carrera electroforética. Los aductos se obtuvieron y purificaron como se señalan en el apartado 7.2, minimizando las contaminaciones de proteínas externas a la muestra. Todo el material estaba estéril y las soluciones se prepararon con agua miliQ estéril y en el momento de uso. Para el control negativo de la secuenciación se emplearon células silvestres y para la muestra problema células del transformante GUS146. Parte de este gel se destinó a realizar un Northern blot, empleando una muestra de GUS146 y un control de RNA, para determinar exactamente en qué posición del gel quedaba la banda del retardo de RNA. Las otras muestras del mismo gel se filetearon con un bisturí en bandas de 1 mm de ancho y se guardaron en fijador (8% ácido acético y 46% metanol) a 4° C hasta tener el resultado de la hibridación y conocer qué bandas contenían el retardo de RNA en la muestra GUS146 y la equivalente a la muestra control negativo. De esta última, se tomó una banda mayor de gel para subsanar posibles errores de medida en la determinación de la banda y asegurar que, al menos, se escogió el mismo fondo proteico.

La secuenciación de la banda de aductos RNA-proteínas se llevó a cabo en el Servicio de Proteómica del Centro de Investigaciones del Príncipe Felipe, Valencia. Llevaron a cabo una digestión con tripsina de las proteínas. Realizaron un análisis de los fragmentos peptídicos mediante un análisis por espectrometría de masas con un nano LC-MS (QSTAR XL, ABI). Emplearon el algoritmo de búsqueda MASCOT para identificar los fragmentos tripticos en las bases de datos.

Los controles realizados por el servicio incluyen un control de digestión (digestión en paralelo de una banda de 125 ng de BSA) y un control de contaminantes (la inclusión de una alícuota de gel en blanco y un pocillo sin

gel)). Los espectrómetros de masas se calibran antes de cada análisis y la calidad de los espectros obtenidos se comprueba visualmente. La sensibilidad de los análisis se evalúa mediante la identificación de 200 fmoles de mioglobina.

## 9. Comprobación *in vitro* de la unión de las proteínas RB38 y PDI a la 5'UTR de *rbcl*.

### 9.1 Expresión y purificación *in vitro* de RB38 y PDI.

Los vectores de expresión pET23a con la secuencia de RB38 y PDI de *C. reinhardtii*, fueron cedidos por S.P. Mayfield (Department of Cell Biology, Scripps Research Institute, La Jolla, California) y permiten obtener las proteínas con una cola de 6 histidinas. Se utilizaron 100 ng de estos vectores para transformar células competentes de la cepa BL21 (DE3) pLys de *E. coli*. Las células competentes y la transformación se realizaron según el protocolo previamente descrito.

Partiendo de 3 ml de precultivo en LBA, se inocularon 100 ml de LBA con 25 µg/ml de cloranfenicol. El cultivo se incubó a 37° C en agitación hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> de 0.4-0.6. Se indujo la expresión de las proteínas con la adición de IPTG a una concentración final de 1 mM, creciendo las células a 37° C durante 6 horas y 15 minutos. Se recogieron las células (8000g, 5 minutos) en tubos de 50 ml estériles, se lavaron en agua estéril destilada y el sedimento se guardó a -80° C. Los sedimentos se resuspendieron en 1.2 ml de tampón de interacción (NaCl 300 mM, tampón fosfato sódico 50 mM (pH 7.2), imidazol 10 mM, pH final 8.0). Las células se sonicaron en hielo 5 veces 30 segundos y la muestra se clarificó por centrifugación (15000g, 20 minutos). Las proteínas se purificaron mediante una resina de cromatografía de Ni-NTA Hys (Novagen). Se preparó la resina lavándola dos veces con 1.6 ml de tampón de interacción. Se incubó el extracto proteico con 400 µl de resina durante 1 hora a 4° C en agitación. La elución de las proteínas se llevó a cabo en columna; se lavaron con 30 volúmenes de tampón de interacción y 20 volúmenes de tampón de lavado (NaCl 300 mM, tampón fosfato sódico 50 mM (pH 7.2), imidazol 20 mM, pH final 8.0). La elución de las proteínas se llevó a cabo con 7.5 volúmenes de tampón de elución (NaCl 300 mM, tampón fosfato sódico 50 mM (pH 7.2), imidazol 250 mM, pH final 8.0). Se realizó un seguimiento de las proteínas eluidas en fracciones de 500 µl midiendo la A<sub>280</sub>. Las fracciones con mayor concentración

de proteínas se juntaron y conservaron a -80°C. Se comprobó la calidad de la purificación mediante un gel SDS-PAGE al 10% con un pregel al 4% teñido con Coomassie. La electroforesis se desarrolló 30 minutos a 70V y 1h y 30 minutos a 100V. Las muestras se dializaron frente a un tampón de diálisis (tampón Tris HCl 20 mM, KAc 100 mM, EDTA 0.2 mM, DTT 2 mM, glicerol 20%) a 4° C durante toda la noche. Se cuantificaron las proteínas mediante el método Bradford, se hicieron alícuotas de 50 µl y se conservaron a -80° C.

## 9.2 Obtención de la 5'UTR de *rbcl* para el ensayo de interacción *in vitro*.

La obtención de la 5'UTR sin modificaciones en su extremo 5' requirió previamente la modificación del vector de expresión pSP64 (Promega).

### 9.2.a. Mutagénesis del promotor SP6 en un vector poliA, SP64.

La síntesis *in vitro* de un RNA específico que reúna determinadas características de secuencia en el extremo 5' requiere la modificación de cualquier promotor habitual de los vectores de transcripción. La RNA polimerasa SP6 reconoce el promotor ATTAGGTGACACTATA<sup>G</sup>AAGNG y comienza la síntesis del transcrito desde la base marcada en rojo en el promotor. La necesidad de mantener inalterados los ribonucleótidos del extremo 5' de los transcritos requirió, en primer lugar, realizar una mutagénesis dirigida de este promotor para comprobar el efecto que el cambio del promotor, por el que corresponde a la posición +1 de la 5'UTR, tiene en la tasa de transcripción. Sobre un plásmido pSP64 polyA (Promega) se realizó una mutagénesis dirigida (kit QuickChange Site-Directed Mutagenesis, Stratagene). Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos complementarios que incluyen la mutación puntual (G→A):

- Promotor SP64 5' → 5' ATTTAGGTGACACTATA<sup>A</sup>AATGT3'

- Promotor SP64 3' → 5' ACATT<sup>T</sup>TATAGTGTACCTAAAT3'

Se ha marcado la mutación y se ha subrayado la secuencia mínima del promotor. La mutagénesis se llevó a cabo mediante 16 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 94° C, 1 minuto a 53° C y 12 minutos de síntesis a 68° C, precedidos por 1 minuto de desnaturalización a 94° C. El plásmido mutado se empleó para comprobar la eficiencia de la transcripción desde este nuevo promotor. La tasa de transcripción se ve afectada por la mutación realizada pero es lo suficientemente alta como para obtener transcritos para realizar experimentos *in vitro*.

### 9.2.b. Modificación de la secuencia de policlonaje y clonación de la 5' UTR en un vector SP64poliA.

Se introdujo un sitio de restricción *SwaI* delante del promotor de SP6 y se reemplazó el promotor y la secuencia de policlonaje por una secuencia de policlonaje menor (*SwaI*, *BspEI*, *EcoRV* y *SacI*), empleando dos oligonucleótidos complementarios entre sí.

SP6\*-5' → 5' AAATCCGGAGATATCGAGCT 3'

SP6\*-3' → 3' CGATATCTCCGGAATT 3'

En el plásmido resultante se clonó la 5' UTR de *rbcl*. Utilizando los sitios *BspEI* y *EcoRV* se introdujo la secuencia desde +41 → +90, empleando oligonucleótidos complementarios, como se describe en 2.4. Sobre el plásmido resultante se clonó la región +1 → +41, usando la misma estrategia anterior, empleando los sitios de restricción *SwaI*-*BspEI*. En este caso los oligonucleótidos insertados incluyen el promotor de SP6 delante de +1.

### 9.2.c. Transcripción *in vitro* de la región 5' UTR de *rbcl*.

Se transcribió *in vitro*, desde el promotor de SP6 mutado, la región 5' UTR de *rbcl* según el manual de instrucciones de la casa comercial. En un volumen final de 20 µl se utilizó 1 µg de DNA molde y 3-5 µl de [ $\alpha^{32}$ P] UTP (800 Ci/mmol), MP Biomedicals, 1 µl de RNA polimerasa SP6 (MEGAscript High Yield Transcription Kit, Ambion) con 10 unidades de inhibidor de RNasa (RNasaOTT Recombinant RNasa Inhibitor, Invitrogen), dNTPS (ATP, CTP, UTP y GTP 2 mM, ) y tampón de reacción 1X (Tris-HCl 160 mM pH 8, MgCl<sub>2</sub> 24 mM, DTT 40 mM, espermidina 8 mM) incubándolo durante 5 horas a 37° C. La sonda se purificó usando una columna de exclusión molecular Sephadex G-50 (Mini Quick Spin Columns, Qiagen) siguiendo las instrucciones del manual del producto. El transcrito radiactivo de la 5' UTR de *rbcl* se cuantificó en un contador de centelleo líquido con 2 µl de la transcripción en 5 ml de Cocktail 22 for liquid scintillation (Formascint, Scharlau). También se cuantificó el rendimiento de la transcripción estimando la concentración de RNA con la A<sub>260</sub>.

### 9.3 Ensayo de interacción *in vitro*.

Para los ensayos de interacción se utilizaron 275 ng de RNA radiactivo (10<sup>5</sup> cpm) y 5 µM de proteínas, obtenidas según el apartado 8.1. Las interacciones se realizaron en el tampón de diálisis con MgCl<sub>2</sub> 40 nM, 10 unidades de inhibidor de RNasa (RNasaOUT Recombinant RNasa Inhibitor, Invitrogen), 1 µl de tRNA (5



µg/µl) en un volumen final de 15 µl. Las proteínas se incubaron a temperatura ambiente 20 minutos en este tampón y tras la adición del RNA marcado se incubaron 30 minutos más a temperatura ambiente. Se entrecruzaron con luz UV 3 minutos sobre hielo y se incubaron con 20 µg de RNasa A (1 hora a 37° C) en un volumen final de 20 µl. Las interacciones se resolvieron en un gel SDS-PAGE al 14% con un pregel al 4% previamente desnaturalizadas en el tampón de carga. El gel se secó en papel Watman (30 minutos a 80° C) y se expuso a una autorradiografía como se describe en el apartado 5.2.

## 10. Análisis del extremo 5' del RNA por extensión del cebador.

### 10.1 Extensión del cebador con un oligonucleótido marcado con un fluoróforo.

Sobre 10 µg de RNA total de los transformantes +157, 23, 5, 20 y 25 se realizaron las reacciones de retrotranscripción empleando el oligonucleótido **GUS146-3'** (apartado 8.1) marcado en 5' con el fluoróforo (carboxifluoresceína, FAM de Applied Biosystem). El oligonucleótido hibrida desde las posiciones 146 hasta 131 del gen *uidA*. Se desnaturalizaron 10 µg de RNA (5 min, 65° C y 1 minutos en hielo) con 2 pmoles de oligonucleótidos y dNTPs (10 mM). Se añadieron 10 unidades de inhibidor de RNasa (RNasaOUT Recombinant RNasa Inhibitor, Invitrogene), DTT 5 mM, tampón comercial de la retrotranscriptasa 1x y 200 unidades de SuperScriptIII RT (Invitrogene). Se incubó 1 hora a 55° C, protegiendo las muestras de la luz directa, y se inactivó la reacción por calor (15 minutos a 70° C). Se degradó el RNA de los híbridos con 2 unidades de RNasa H (20 minutos a 37° C). Las muestras se procesaron como muestras de análisis de microsatélites en el Servei de Secuenciació de la Universitat de València.

### 10.2 Extensión del cebador marcados con $\gamma^{32}\text{P}$ en 5'.

#### 10.2.a. Marcaje del oligonucleótido en 5'.

El oligonucleótido **GUS146-3'** (apartado 8.1) empleado para la realización de la RT, localizado desde la posición 131 hasta la 111 del gen *uidA*, se marcó radiactivamente en su extremo 5'. En la reacción se marcaron 40 picomoles de oligonucleótido con 5 µl de [ $\gamma^{32}\text{P}$ ] (3000 Ci/mol x ml; 10 µCi/µl) empleando 10 unidades de T4 PNK (Fermentas) en el tampón A de la enzima (500mM Tris-HCl, 100mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM DTT, 1mM espermidina y 1mM EDTA) durante 30 minutos a

37° C según el protocolo de la casa comercial. El oligonucleótido marcado se purificó mediante 2 lavados con fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) (15000 g, 5 min) y se precipitó con isopropanol y NaAc 0.3 M 1 hora a -80° C. La muestra se recogió (17000 g, 30 min) y, tras ser lavada con etanol al 70%, se resuspendió en 10 µl de agua con DEPC. Se diluyó la muestra para que 1 µl alcanzara los 60 cps en el Geiger. La muestra se conservó a -20° C.

#### 10.2.b. Retrotranscripción.

Sobre 20 µg de RNA total de los transformantes **+157**, **5** y **20** se realizaron las reacciones de retrotranscripción empleando el oligonucleótido **GUS146-3'** (apartado 8.1) marcado radiactivamente. Al RNA desnaturalizado (15 min, 65° C y 5 minutos en hielo) se le añadieron 2 µl del oligonucleótido marcado radiactivamente, 10 unidades de inhibidor de RNasa (RNasaOUT Recombinant RNasa Inhibitor, Invitrogene) y dNTPs (2 mM), preincubando (10 minutos a 25° C) la muestra con el tampón comercial de la enzima (250 mM Tris-HCl, 250 mM KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM DTT). Se añadieron 10 unidades de la enzima RT, (M-MuLV Reverse Transcriptase, Fermentas) y se llevó a cabo la reacción 1 hora a 42° C. Las muestras se purificaron con dos lavados de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) (15000 g, 5 min) y se precipitaron con 1 volumen de isopropanol y NaAc 0.3 M durante 1 hora a -80° C. La muestra se recogió (17000 g, 30 min) y, tras ser lavada con etanol al 70%, se resuspendió en 10 µl de agua con DEPC.

#### 10.2.c. Gel de secuenciación.

Se realizó un gel de poliacrilamida al 6% con urea 7.5 M en tampón TBE 1 x y antes de cargar las muestra la electroforesis se puso en marcha 15 minutos a 1600 V. Se cargaron 2 µl de muestra en cada carrera y se dejó resolver durante 4 horas y 30 minutos a 2000V. El gel se fijó durante 15 minutos con 15% metanol, 5% HAc y se secó sobre papel Watman a 80° C durante 2 horas. El gel se expuso a una autorradiografía (BioMax MS Film, KODAK) en un casete preparado para este fin, Hypercassette<sup>TM</sup> Amersham Bioscience.

Como marcador de tamaños moleculares en el gel se empleó una reacción de secuenciación de la región 5' del gen quimérico +157 (5'UTR y una porción de la región codificante de *rbcL* + el gen reportero *uidA*, GUS). Se utilizaron 2 µg de plásmido +157 como molde (apartado 2.1) con 1 pmol de oligonucleótido GUS146 (apartado 8.1) utilizando el kit de secuenciación Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit (USB Corporation) con los nucleótidos marcados con <sup>33</sup>P y

siguiendo el protocolo del manual. También se realizó la reacción de secuenciación control del kit.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abler, ML y Green, PJ. (1996). Control of mRNA stability in higher plants. *Plant Mol. Biol.* 32, 63-78.
- Adams, CC y Stern, DB. (1990). Control of mRNA stability in chloroplasts by 3' inverted repeats: effects of stem and loop mutations on degradation of psbA mRNA in vitro. *Nucleic Acids Res.* 18, 6003-6010.
- Alegand, T, Peled-Zehavi, H, Katz, Y, y Danon, A. (2006). The chloroplast protein disulfide isomerase RB60 reacts with a regulatory disulfide of the RNA-binding protein RB47. *Plant Cell Physiol* 47, 540-548.
- Allison, LA. (2000). The role of sigma factors in plastid transcription. *Biochimie* 82, 537-548.
- Anderson, LE, Huppe, HC, Li, AD, y Stevens, FJ. (1996). Identification of a potential redox-sensitive interdomain disulfide in the sedoheptulose biphosphatase of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* 10, 553-560.
- Anderson, P y Kedersha, N. (2006). RNA granules. *J. Cell Biol.* 172, 803-808.
- Anthonisen, IL, Kasai, S, Kato, K, Salvador, ML, y Klein, U. (2002). Structural and functional characterization of a transcription-enhancing sequence element in the *rbcl* gene of the *Chlamydomonas* chloroplast genome. *Curr. Genet.* 41, 349-356.
- Anthonisen, IL, Salvador, ML, y Klein, U. (2001). Specific sequence elements in the 5' untranslated regions of *rbcl* and *atpB* gene mRNAs stabilize transcripts in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *RNA.* 7, 1024-1033.
- Aoyama, T, Takanami, M, Ohtsuka, E, Taniyama, Y, Marumoto, R, Sato, H, y Ikehara, M. (1983). Essential structure of *E. coli* promoter: effect of spacer length between the two consensus sequences on promoter function. *Nucleic Acids Res.* 11, 5855-5864.
- Arnold, TE, Yu, J, y Belasco, JG. (1998). mRNA stabilization by the *ompA* 5' untranslated region: two protective elements hinder distinct pathways for mRNA degradation. *RNA.* 4, 319-330.
- Auchincloss, AH, Zerges, W, Perron, K, Girard-Bascou, J, y Rochaix, JD. (2002). Characterization of Tbc2, a nucleus-encoded factor specifically required for translation of the chloroplast *psbC* mRNA in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biol.* 157, 953-962.
- Ausube, FM, Brent, R, Kingston, RE, Moore, JG, Seidman, JG, y Smith, JA. (1995). *Current protocols in molecular biology.*

- Auweter, SD, Oberstrass, FC, y Allain, FH.** (2006). Sequence-specific binding of single-stranded RNA: is there a code for recognition? *Nucleic Acids Res.* *34*, 4943-4959.
- Baginsky, S, Shteiman-Kotler, A, Liveanu, V, Yehudai-Resheff, S, Bellaoui, M, Settlage, RE, Shabanowitz, J, Hunt, DF, Schuster, G, y Grisse, W.** (2001). Chloroplast PNPase exists as a homo-multimer enzyme complex that is distinct from the Escherichia coli degradosome. *RNA.* *7*, 1464-1475.
- Baker, KE y Parker, R.** (2004). Nonsense-mediated mRNA decay: terminating erroneous gene expression. *Curr. Opin. Cell Biol.* *16*, 293-299.
- Barkan, A.** (1993). Nuclear Mutants of Maize with Defects in Chloroplast Polysome Assembly Have Altered Chloroplast RNA Metabolism. *Plant Cell* *5*, 389-402.
- Barkan, A y Goldschmidt-Clermont, M.** (2000). Participation of nuclear genes in chloroplast gene expression. *Biochimie* *82*, 559-572.
- Barnes, D, Cohen, A, Bruick, RK, Kantardjieff, K, Fowler, S, Efu, E, y Mayfield, SP.** (2004). Identification and Characterization of a Novel RNA Binding Protein That Associates with the 5'-Untranslated Region of the Chloroplast psbA mRNA. *Biochemistry* *43*, 8541-8550.
- Barnes, D, Franklin, S, Schultz, J, Henry, R, Brown, E, Coragliotti, A, y Mayfield, SP.** (2005). Contribution of 5'- and 3'-untranslated regions of plastid mRNAs to the expression of Chlamydomonas reinhardtii chloroplast genes. *Mol Genet Genomics* *274*, 625-636.
- Barreau, C, Paillard, L, y Osborne, HB.** (2005). AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Res.* *33*, 7138-7150.
- Bhat, S, Tang, L, Krueger, AD, Smith, CL, Ford, SR, Dickey, LF, y Petracek, ME.** (2004). The Fed-1 (CAUU)<sub>4</sub> element is a 5' UTR dark-responsive mRNA instability element that functions independently of dark-induced polyribosome dissociation. *Plant Mol Biol.* *56*, 761-773.
- Bhattacharya, D y Medlin, L.** (1998). Algal phylogeny and the origin of land plants. *Plant Physiol* *116*, 9-15.
- Blatch, GL y Lasse, M.** (1999). The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays* *21*, 932-939.

- Blowers, AD, Bogorad, L, y Shark, KB.** (1989). Studies on *Chlamydomonas* chloroplast transformation: foreign DNA can be stably maintained in the chromosome. *Plant Cell* 1, 123-1132.
- Blowers, AD, Klein, U, Ellmore, GS, y Bogorad, L.** (1993). Functional in vivo analyses of the 3' flanking sequences of the *Chlamydomonas* chloroplast *rbcl* and *psaB* genes. *Mol. Gen. Genet.* 238, 339-349.
- Bohne, AV, Irihimovitch, V, Weihe, A, y Stern, DB.** (2006). *Chlamydomonas reinhardtii* encodes a single sigma70-like factor which likely functions in chloroplast transcription. *Curr. Genet* 49, 333-340.
- Boinski, JJ, Wang, JL, Xu, P, Hotchkiss, T, y Berry, JO.** (1993). Post-transcriptional control of cell type-specific gene expression in bundle sheath and mesophyll chloroplasts of *Amaranthus hypochondriacus*. *Plant Mol Biol.* 22, 397-410.
- Bonham-Smith, PC y Bourque, DP.** (1989). Translation of chloroplast-encoded mRNA: potential initiation and termination signals. *Nucleic Acids Res.* 17, 2057-2080.
- Boudreau, E, Nickelsen, J, Lemaire, SD, Ossenbuhl, F, y Rochaix, JD.** (2000). The *Nac2* gene of *Chlamydomonas* encodes a chloroplast TPR-like protein involved in *psbD* mRNA stability. *EMBO J.* 19, 3366-3376.
- Bouvet, P y Belasco, JG.** (1992). Control of RNase E-mediated RNA degradation by 5'-terminal base pairing in *E. coli*. *Nature* 360, 488-491.
- Boynton, JE, Gillham, NW, Harris, EH, Hosler, JP, Johnson, AM, Jones, AR, Randolph-Anderson, BL, Robertson, D, Klein, TM, Shark, KB, y .** (1988). Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science* 240, 1534-1538.
- Brodli, MR y Ho, TH.** (1991). Heat Shock Causes Selective Destabilization of Secretory Protein mRNAs in Barley Aleurone Cells. *Plant Physiol* 96, 1048-1052.
- Brown, RS.** (2005). Zinc finger proteins: getting a grip on RNA. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15, 94-98.
- Bruce, CA y Stern, DB.** (2001). Plastid transcription: a menage a trois? *Trends Plant Sci.* 6, 45-46.
- Bruick, RK y Mayfield, SP.** (1998). Processing of the *psbA* 5' untranslated region in *Chlamydomonas reinhardtii* depends upon factors mediating ribosome association. *J. Cell Biol.* 143, 1145-1153.

- Buschlen, S, Choquet, Y, Kuras, R, y Wollman, FA. (1991). Nucleotide sequences of the continuous and separated *petA*, *petB* and *petD* chloroplast genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett.* 284, 257-262.
- Carter, ML, Smith, AC, Kobayashi, H, Purton, S, y Herrin, DL. (2004). Structure, circadian regulation and bioinformatic analysis of the unique sigma factor gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynth. Res.* 82, 339-349.
- Chan, MT y Yu, SM. (1998). The 3' untranslated region of a rice alpha-amylase gene functions as a sugar-dependent mRNA stability determinant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 6543-6547.
- Chen, CY y Shyu, AB. (1995). AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem. Sci.* 20, 465-470.
- Chen, Y y Varani, G. (2005). Protein families and RNA recognition. *FEBS J.* 272, 2088-2097.
- Choquet, Y, Goldschmidt-Clermont, M, Girard-Bascou, J, Kuck, U, Bennoun, P, y Rochaix, JD. (1988). Mutant phenotypes support a trans-splicing mechanism for the expression of the tripartite *psaA* gene in the *C. reinhardtii* chloroplast. *Cell* 52, 903-913.
- Choquet, Y y Wollman, FA. (2002). Translational regulations as specific traits of chloroplast gene expression. *FEBS Lett.* 529, 39-42.
- Coburn, GA y Mackie, GA. (1999). Degradation of mRNA in *Escherichia coli*: an old problem with some new twists. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol Biol.* 62, 55-108.
- Cohen, I, Knopf, JA, Irihimovitch, V, y Shapira, M. (2005). A Proposed Mechanism for the Inhibitory Effects of Oxidative Stress on Rubisco Assembly and Its Subunit Expression. *Plant Physiol* ..
- Danon, A y Mayfield, SP. (1991). Light regulated translational activators: identification of chloroplast gene specific mRNA binding proteins. *EMBO J.* 10, 3993-4001.
- Danon, A y Mayfield, SP. (1994). ADP-dependent phosphorylation regulates RNA-binding in vitro: implications in light-modulated translation. *EMBO J.* 13, 2227-2235.
- Daros, JA y Flores, R. (2002). A chloroplast protein binds a viroid RNA in vivo and facilitates its hammerhead-mediated self-cleavage. *EMBO J.* 21, 749-759.



- Dauvillee, D, Stampacchia, O, Girard-Bascou, J, y Rochaix, JD. (2003). Tab2 is a novel conserved RNA binding protein required for translation of the chloroplast *psaB* mRNA. *EMBO J.* 22, 6378-6388.
- Deutscher, MP. (2006). Degradation of RNA in bacteria: comparison of mRNA and stable RNA. *Nucleic Acids Res.* 34, 659-666.
- Dickey, LF, Petracek, ME, Nguyen, TT, Hansen, ER, y Thompson, WF. (1998). Light regulation of *Fed-1* mRNA requires an element in the 5' untranslated region and correlates with differential polyribosome association. *Plant Cell* 10, 475-484.
- Downes, BP y Crowell, DN. (1998). Cytokinin regulates the expression of a soybean beta-expansin gene by a post-transcriptional mechanism. *Plant Mol Biol.* 37, 437-444.
- Drager, RG, Girard-Bascou, J, Choquet, Y, Kindle, KL, y Stern, DB. (1998). In vivo evidence for 5'→3' exoribonuclease degradation of an unstable chloroplast mRNA. *Plant J.* 13, 85-96.
- Drager, RG, Higgs, DC, Kindle, KL, y Stern, DB. (1999). 5' to 3' exoribonucleolytic activity is a normal component of chloroplast mRNA decay pathways. *Plant J.* 19, 521-531.
- Drager, RG, Zeidler, M, Simpson, CL, y Stern, DB. (1996). A chloroplast transcript lacking the 3' inverted repeat is degraded by 3'→5' exoribonuclease activity. *RNA.* 2, 652-663.
- Drapier, D, Girard-Bascou, J, y Wollman, FA. (1992). Evidence for Nuclear Control of the Expression of the *atpA* and *atpB* Chloroplast Genes in *Chlamydomonas*. *Plant Cell* 4, 283-295.
- Dron, M, Rahire, M, y Rochaix, JD. (1982). Sequence of the chloroplast DNA region of *Chlamydomonas reinhardtii* containing the gene of the large subunit of ribulose biphosphate carboxylase and parts of its flanking genes. *J. Mol Biol.* 162, 775-793.
- Dyall, SD, Brown, MT, y Johnson, PJ. (2004). Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science.* 304, 253-257.
- Eberhard, S, Drapier, D, y Wollman, FA. (2002). Searching limiting steps in the expression of chloroplast-encoded proteins: relations between gene copy number, transcription, transcript abundance and translation rate in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* 31, 149-160.

- Eibl, C, Zou, Z, Beck a, Kim, M, Mullet, J, y Koop, HU. (1999). In vivo analysis of plastid psbA, rbcL and rpl32 UTR elements by chloroplast transformation: tobacco plastid gene expression is controlled by modulation of transcript levels and translation efficiency. *Plant J.* 19, 333-345.
- Emory, SA, Bouvet, P, y Belasco, JG. (1992). A 5'-terminal stem-loop structure can stabilize mRNA in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 6, 135-148.
- Erickson, B, Stern, DB, y Higgs, DC. (2005). Microarray analysis confirms the specificity of a *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast RNA stability mutant. *Plant Physiol* 137, 534-544.
- Erickson, JM, Rahire, M, y Rochaix, JD. (1984). *Chlamydomonas reinhardtii* gene for the 32 000 mol. wt. protein of photosystem II contains four large introns and is located entirely within the chloroplast inverted repeat. *EMBO J.* 3, 2753-2762.
- Eulalio, A, Behm-Ansmant, I, y Izaurralde, E. (2007). P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat. Rev. Mol Cell Biol.* 8, 9-22.
- Fan, WH, Woelfle, MA, y Mosig, G. (1995). Two copies of a DNA element, 'Wendy', in the chloroplast chromosome of *Chlamydomonas reinhardtii* between rearranged gene clusters. *Plant Mol. Biol.* 29, 63-80.
- Fargo, DC, Boynton, JE, y Gillham, NW. (1999). Mutations altering the predicted secondary structure of a chloroplast 5' untranslated region affect its physical and biochemical properties as well as its ability to promote translation of reporter mRNAs both in the *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast and in *Escherichia coli*. *Mol Cell Biol.* 19, 6980-6990.
- Fargo, DC, Zhang, M, Gillham, NW, y Boynton, JE. (1998). Shine-Dalgarno-like sequences are not required for translation of chloroplast mRNAs in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts or in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 257, 271-282.
- Fedoroff, NV. (2002). RNA-binding proteins in plants: the tip of an iceberg? *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 452-459.
- Ferris, PJ y Goodenough, UW. (1994). The mating-type locus of *Chlamydomonas reinhardtii* contains highly rearranged DNA sequences. *Cell* 76, 1135-1145.
- Fisk, DG, Walker, MB, y Barkan, A. (1999). Molecular cloning of the maize gene *crp1* reveals similarity between regulators of mitochondrial and chloroplast gene expression. *EMBO J.* 18, 2621-2630.

- Fong, SE y Surzycki, SJ. (1992). Chloroplast RNA polymerase genes of *Chlamydomonas reinhardtii* exhibit an unusual structure and arrangement. *Curr. Genet* 21, 485-497.
- Franklin, SE y Mayfield, SP. (2004). Prospects for molecular farming in the green alga *Chlamydomonas*. *Curr. Opin. Plant Biol* 7, 159-165.
- Garneau, NL, Wilusz, J, y Wilusz, CJ. (2007). The highways and byways of mRNA decay. *Nat. Rev. Mol Cell Biol.* 8, 113-126.
- Gillham, NW, Boynton, JE, y Hauser, CR. (1994). Translational regulation of gene expression in chloroplasts and mitochondria. *Annu. Rev. Genet* 28, 71-93.
- Goldschmidt-Clermont, M. (1998). Coordination of nuclear and chloroplast gene expression in plant cells. *Int. Rev. Cytol.* 177, 115-180.
- Gruissem, W. (1989). Chloroplast gene expression: how plants turn their plastids on. *Cell* 56, 161-170.
- Gruissem, W, Elsner-Menzel, C, Latshaw, S, Narita, JO, Schaffer, MA, y Zurawski, G. (1986). A subpopulation of spinach chloroplast tRNA genes does not require upstream promoter elements for transcription. *Nucleic Acids Res.* 14, 7541-7556.
- Gruissem, W y Zurawski, G. (1985). Analysis of promoter regions for the spinach chloroplast *rbcl*, *atpB* and *psbA* genes. *EMBO J.* 4, 3375-3383.
- Guhaniyogi, J y Brewer, G. (2001). Regulation of mRNA stability in mammalian cells. *Gene* 265, 11-23.
- Gumpel, NJ, Ralley, L, Girard-Bascou, J, Wollman, FA, Nugent, JH, y Purton, S. (1995). Nuclear mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* defective in the biogenesis of the cytochrome *b6f* complex. *Plant Mol Biol.* 29, 921-932.
- Gutierrez, RA, MacIntosh, GC, y Green, PJ. (1999). Current perspectives on mRNA stability in plants: multiple levels and mechanisms of control. *Trends. Plant Sci.* 4, 429-438.
- Hajdukiewicz, PT, Allison, LA, y Maliga, P. (1997). The two RNA polymerases encoded by the nuclear and the plastid compartments transcribe distinct groups of genes in tobacco plastids. *EMBO J.* 16, 4041-4048.
- Hambraeus, G, Karhumaa, K, y Rutberg, B. (2002). A 5' stem-loop and ribosome binding but not translation are important for the stability of *Bacillus subtilis* *aprE* leader mRNA. *Microbiology* 148, 1795-1803.

- Hambraeus, G, von, WC, y Hederstedt, L. (2003). Genome-wide survey of mRNA half-lives in *Bacillus subtilis* identifies extremely stable mRNAs. *Mol Genet Genomics* 269, 706-714.
- Harris, EH. (2001). *Chlamydomonas* as a model organism. *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.* 52, 363-406.
- Hauser, CR, Gillham, NW, y Boynton, JE. (1996). Translational regulation of chloroplast genes. Proteins binding to the 5'-untranslated regions of chloroplast mRNAs in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* 271, 1486-1497.
- Hauser, CR, Gillham, NW, y Boynton, JE. (1998). Regulation of chloroplast translation. In *The molecular biology of chloroplasts and mitochondria in Chlamydomonas*, Rochaix JD, Goldschmidt-Clermont M, and Merchant S, eds. Kluwer Academic Publishers), pp. 197-217.
- Hayes, R, Kudla, J, y Gruissem, W. (1999). Degrading chloroplast mRNA: the role of polyadenylation. *Trends Biochem. Sci.* 24, 199-202.
- Hedtke, B, Borner, T, y Weihe, A. (1997). Mitochondrial and chloroplast phage-type RNA polymerases in *Arabidopsis*. *Science* 277, 809-811.
- Herrin, DL y Nickelsen, J. (2004). Chloroplast RNA processing and stability. *Photosynth. Res.* 82, 301-314.
- Hess, WR y Borner, T. (1999). Organellar RNA polymerases of higher plants. *Int. Rev. Cytol.* 190, 1-59.
- Higgs, DC, Shapiro, RS, Kindle, KL, y Stern, DB. (1999). Small cis-acting sequences that specify secondary structures in a chloroplast mRNA are essential for RNA stability and translation. *Mol Cell Biol.* 19, 8479-8491.
- Hirose, T y Sugiura, M. (1996). Cis-acting elements and trans-acting factors for accurate translation of chloroplast *psbA* mRNAs: development of an in vitro translation system from tobacco chloroplasts. *EMBO J.* 15, 1687-1695.
- Hirose, T y Sugiura, M. (2001). Involvement of a site-specific trans-acting factor and a common RNA-binding protein in the editing of chloroplast mRNAs: development of a chloroplast in vitro RNA editing system. *EMBO J.* 20, 1144-1152.
- Hong, S y Spreitzer, RJ. (1994). Nuclear Mutation Inhibits Expression of the Chloroplast Gene That Encodes the Large Subunit of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase. *Plant Physiol* 106, 673-678.

- Hua, XJ, Van de, CB, Van, MM, y Verbruggen, N. (2001). The 5' untranslated region of the At-P5R gene is involved in both transcriptional and post-transcriptional regulation. *Plant J.* 26, 157-169.
- Hwang, S, Kawazoe, R, y Herrin, DL. (1996). Transcription of *tufA* and other chloroplast-encoded genes is controlled by a circadian clock in *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 996-1000.
- Irihimovitch, V y Shapira, M. (2000). Glutathione redox potential modulated by reactive oxygen species regulates translation of Rubisco large subunit in the chloroplast. *J. Biol. Chem.* 275, 16289-16295.
- Ishizaki, Y, Tsunoyama, Y, Hatano, K, Ando, K, Kato, K, Shinmyo, A, Kobori, M, Takeba, G, Nakahira, Y, y Shiina, T. (2005). A nuclear-encoded sigma factor, *Arabidopsis* SIG6, recognizes sigma-70 type chloroplast promoters and regulates early chloroplast development in cotyledons. *Plant J.* 42, 133-144.
- Jahn, D. (1992). Expression of the *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast tRNA(Glu) gene in a homologous in vitro transcription system is independent of upstream promoter elements. *Arch. Biochem. Biophys.* 298, 505-513.
- Jain, C, Deana, A, y Belasco, JG. (2002). Consequences of RNase E scarcity in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 43, 1053-1064.
- Jankowsky, E y Bowers, H. (2006). Remodeling of ribonucleoprotein complexes with DExH/D RNA helicases. *Nucleic Acids Res.* 34, 4181-4188.
- Jenkins, BD, Kulhanek, DJ, y Barkan, A. (1997). Nuclear mutations that block group II RNA splicing in maize chloroplasts reveal several intron classes with distinct requirements for splicing factors. *Plant Cell* 9, 283-296.
- Johnson, CH y Schmidt, GW. (1993). The *psbB* gene cluster of the *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast: sequence and transcriptional analyses of *psbN* and *psbH*. *Plant Mol Biol.* 22, 645-658.
- Johnson, MA, Perez-Amador, MA, Lidder, P, y Green, PJ. (2000). Mutants of *Arabidopsis* defective in a sequence-specific mRNA degradation pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 13991-13996.
- Kanamaru, K y Tanaka, K. (2004). Roles of chloroplast RNA polymerase sigma factors in chloroplast development and stress response in higher plants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 2215-2223.
- Kasai, S, Yoshimura, S, Ishikura, K, Takaoka, Y, Kobayashi, MC, Kato, K, y Shinmyo, A. (2003). Effect of coding regions on chloroplast gene expression in

*Chlamydomonas reinhardtii*. Journal of Bioscience and Bioengineering 276, 276-282.

-Kawazoe, R, Hwang, S, y Herrin, DL. (2000). Requirement for cytoplasmic protein synthesis during circadian peaks of transcription of chloroplast-encoded genes in *Chlamydomonas*. Plant Mol Biol. 44, 699-709.

-Kim, J y Mayfield, SP. (1997). Protein disulfide isomerase as a regulator of chloroplast translational activation. Science 278, 1954-1957.

-Kim, M, Thum, KE, Morishige, DT, y Mullet, JE. (1999). Detailed architecture of the barley chloroplast psbD-psbC blue light-responsive promoter. J. Biol. Chem. 274, 4684-4692.

-Klauff, P y Grussem, W. (1991). Changes in Chloroplast mRNA Stability during Leaf Development. Plant Cell 3, 517-529.

-Klauff, P, Mundt, SM, y Steger, G. (1997). Complex formation of the spinach chloroplast psbA mRNA 5' untranslated region with proteins is dependent on the RNA structure. RNA. 3, 1468-1479.

-Klein, U, De Camp, JD, y Bogorad, L. (1992). Two types of chloroplast gene promoters in *Chlamydomonas reinhardtii*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 89, 3453-3457.

-Klein, U, Salvador, ML, y Bogorad, L. (1994). Activity of the *Chlamydomonas* chloroplast *rbcl* gene promoter is enhanced by a remote sequence element. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 91, 10819-10823.

-Krecic, AM y Swanson, MS. (1999). hnRNP complexes: composition, structure, and function. Curr. Opin. Cell Biol. 11, 363-371.

-Kuchka, MR, Goldschmidt-Clermont, M, van, DJ, y Rochaix, JD. (1989). Mutation at the *Chlamydomonas* nuclear NAC2 locus specifically affects stability of the chloroplast psbD transcript encoding polypeptide D2 of PS II. Cell 58, 869-876.

-Kudla, J, Hayes, R, y Grussem, W. (1996). Polyadenylation accelerates degradation of chloroplast mRNA. EMBO J. 15, 7137-7146.

-Kushner, SR. (2002). mRNA decay in *Escherichia coli* comes of age. J. Bacteriol. 184, 4658-4665.

-Lee, H, Bingham, SE, y Webber, AN. (1996). Function of 3' non-coding sequences and stop codon usage in expression of the chloroplast *psaB* gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Mol Biol. 31, 337-354.

- Lerbs-Mache, S.** (1993). The 110-kDa polypeptide of spinach plastid DNA-dependent RNA polymerase: single-subunit enzyme or catalytic core of multimeric enzyme complexes? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *90*, 5509-5513.
- Levitan, A, Trebitsh, T, Kiss, V, Pereg, Y, Dangoor, I, y Danon, A.** (2005). Dual targeting of the protein disulfide isomerase RB60 to the chloroplast and the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *102*, 6225-6230.
- Levy, H, Kindle, KL, y Stern, DB.** (1999). Target and specificity of a nuclear gene product that participates in mRNA 3'-end formation in *Chlamydomonas* chloroplasts. *J. Biol. Chem.* *274*, 35955-35962.
- Lidder, P, Gutierrez, RA, Salome, PA, McClung, CR, y Green, PJ.** (2005). Circadian control of messenger RNA stability. Association with a sequence-specific messenger RNA decay pathway. *Plant Physiol* *138*, 2374-2385.
- Liere, K y Maliga, P.** (1999). In vitro characterization of the tobacco *rpoB* promoter reveals a core sequence motif conserved between phage-type plastid and plant mitochondrial promoters. *EMBO J.* *18*, 249-257.
- Linder, P.** (2006). Dead-box proteins: a family affair--active and passive players in RNP-remodeling. *Nucleic Acids Res.* *34*, 4168-4180.
- Lisitsky, I, Kotler, A, y Schuster, G.** (1997). The mechanism of preferential degradation of polyadenylated RNA in the chloroplast. The exoribonuclease 100RNP/polynucleotide phosphorylase displays high binding affinity for poly(A) sequence. *J. Biol. Chem.* *272*, 17648-17653.
- López-Juez, E y Pyke, KA.** (2005). Plastids unleashed: their development and their integration in plant development. *Int. J. Dev. Biol.* *49*, 557-577.
- Lurin, C, Andres, C, Aubourg, S, Bellaoui, M, Bitton, F, Bruyere, C, Caboche, M, Debast, C, Gualberto, J, Hoffmann, B, Lecharny, A, Le, RM, Martin-Magniette, ML, Mireau, H, Peeters, N, Renou, JP, Szurek, B, Taconnat, L, y Small, I.** (2004). Genome-wide analysis of *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell* *16*, 2089-2103.
- Mackie, GA.** (1998). Ribonuclease E is a 5'-end-dependent endonuclease. *Nature* *395*, 720-723.
- Mandecki, W y Reznikoff, WS.** (1982). A lac promoter with a changed distance between -10 and -35 regions. *Nucleic Acids Res.* *11*, 903-912.
- Manen, JF, Savolainen, V, y Simon, P.** (1994). The *atpB* and *rbcl* promoters in plastid DNAs of a wide dicot range. *J. Mol. Evol.* *38*, 577-582.

- Maul, JE, Lilly, JW, Cui, L, dePamphilis, CW, Miller, W, Harris, EH, y Stern, DB. (2002). The *Chlamydomonas reinhardtii* plastid chromosome: islands of genes in a sea of repeats. *Plant Cell* 14, 2659-2679.
- Mayfield, SP, Cohen, A, Danon, A, y Yohn, CB. (1994). Translation of the psbA mRNA of *Chlamydomonas reinhardtii* requires a structured RNA element contained within the 5' untranslated region. *J. Cell Biol.* 127, 1537-1545.
- McClure, BA, Hagen, G, Brown, CS, Gee, MA, y Guilfoyle, TJ. (1989). Transcription, organization, and sequence of an auxin-regulated gene cluster in soybean. *Plant Cell* 1, 229-239.
- McCormac, DJ, Litz, H, Wang, J, Gollnick, PD, y Berry, JO. (2001). Light-associated and processing-dependent protein binding to 5' regions of rbcL mRNA in the chloroplasts of a C4 plant. *J. Biol. Chem.* 276, 3476-3483.
- Memon, AR, Meng, B, y Mullet, JE. (1996). RNA-binding proteins of 37/38 kDa bind specifically to the barley chloroplast psbA 3'-end untranslated RNA. *Plant Mol Biol.* 30, 1195-1205.
- Meyer, S, Temme, C, y Wahle, E. (2004). Messenger RNA turnover in eukaryotes: pathways and enzymes. *Crit Rev. Biochem. Mol Biol.* 39, 197-216.
- Mitchell, P y Tollervey, D. (2003). An NMD pathway in yeast involving accelerated deadenylation and exosome-mediated 3'→5' degradation. *Mol Cell* 11, 1405-1413.
- Mittag, M. (2003). The function of circadian RNA-binding proteins and their cis-acting elements in microalgae. *Chronobiol. Int.* 20, 529-541.
- Mohanty, BK y Kushner, SR. (2000). Polynucleotide phosphorylase functions both as a 3' right-arrow 5' exonuclease and a poly(A) polymerase in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 11966-11971.
- Monde, RA, Schuster, G, y Stern, DB. (2000). Processing and degradation of chloroplast mRNA. *Biochimie* 82, 573-582.
- Monod, C, Goldschmidt-Clermont, M, y Rochaix, JD. (1992). Accumulation of chloroplast psbB RNA requires a nuclear factor in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Gen Genet* 231, 449-459.
- Moore, MJ. (2005). From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science* 309, 1514-1518.



- Murakami, S, Kuehnle, K, y Stern, DB. (2005). A spontaneous tRNA suppressor of a mutation in the *Chlamydomonas reinhardtii* nuclear MCD1 gene required for stability of the chloroplast petD mRNA. *Nucleic Acids Res.* 33, 3372-3380.
- Nagashima, A, Hanaoka, M, Shikanai, T, Fujiwara, M, Kanamaru, K, Takahashi, H, y Tanaka, K. (2004). The multiple-stress responsive plastid sigma factor, SIG5, directs activation of the psbD blue light-responsive promoter (BLRP) in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 45, 357-368.
- Nakamura, T, Ohta, M, Sugiura, M, y Sugita, M. (2001). Chloroplast ribonucleoproteins function as a stabilizing factor of ribosome-free mRNAs in the stroma. *J. Biol. Chem.* 276, 147-152.
- Nakamura, T, Schuster, G, Sugiura, M, y Sugita, M. (2004). Chloroplast RNA-binding and pentatricopeptide repeat proteins. *Biochem. Soc. Trans.* 32, 571-574.
- Nickelsen, J. (2003). Chloroplast RNA-binding proteins. *Curr. Genet.* 43, 392-399.
- Nickelsen, J. (1998). Chloroplast RNA stability. In *The molecular biology of chloroplasts and mitochondria in Chlamydomonas.*, J.-D.Rochaix, M.Goldschmidt-Clermont, and S.Merchant, eds. (London: Kluwer Academic Publishers), pp. 151-163.
- Nickelsen, J, Fleischmann, M, Boudreau, E, Rahire, M, y Rochaix, JD. (1999). Identification of cis-acting RNA leader elements required for chloroplast psbD gene expression in *Chlamydomonas*. *Plant Cell* 11, 957-970.
- Nickelsen, J y Kuck, U. (2000). The unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* as an experimental system to study chloroplast RNA metabolism. *Naturwissenschaften* 87, 97-107.
- Nickelsen, J y Link, G. (1993). The 54 kDa RNA-binding protein from mustard chloroplasts mediates endonucleolytic transcript 3' end formation in vitro. *Plant J.* 3, 537-544.
- Nickelsen, J, van, DJ, Rahire, M, y Rochaix, JD. (1994). Determinants for stability of the chloroplast psbD RNA are located within its short leader region in *Chlamydomonas reinhardtii*. *EMBO J.* 13, 3182-3191.
- Olivas, W y Parker, R. (2000). The Puf3 protein is a transcript-specific regulator of mRNA degradation in yeast. *EMBO J.* 19, 6602-6611.
- Ossenbuhl, F y Nickelsen, J. (2000). cis- and trans-Acting determinants for translation of psbD mRNA in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Cell Biol.* 20, 8134-8142.

- Ow, MC, Liu, Q, y Kushner, SR. (2000). Analysis of mRNA decay and rRNA processing in *Escherichia coli* in the absence of RNase E-based degradosome assembly. *Mol Microbiol.* 38, 854-866.
- Palmer, JD. (1985). Comparative organization of chloroplast genomes. *Annu. Rev. Genet* 19, 325-354.
- Parker, R y Song, H. (2004). The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat. Struct. Mol Biol.* 11, 121-127.
- Perez-Canadillas, JM y Varani, G. (2001). Recent advances in RNA-protein recognition. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11, 53-58.
- Pfannschmidt, T y Liere, K. (2005). Redox regulation and modification of proteins controlling chloroplast gene expression. *Antioxid. Redox. Signal.* 7, 607-618.
- Pfannschmidt, T, Nilsson, A, Tullberg, A, Link, G, y Allen, JF. (1999). Direct transcriptional control of the chloroplast genes *psbA* and *psaAB* adjusts photosynthesis to light energy distribution in plants. *IUBMB. Life* 48, 271-276.
- Randolph-Anderson, BL, Boynton, JE, Gillham, NW, Harris, EH, Johnson, AM, Dorthu, MP, y Matagne, RF. (1993). Further characterization of the respiratory deficient *dum-1* mutation of *Chlamydomonas reinhardtii* and its use as a recipient for mitochondrial transformation. *Mol Gen Genet* 236, 235-244.
- Raven, JA y Allen, JF. (2003). Genomics and chloroplast evolution: what did cyanobacteria do for plants? *Genome Biol.* 4, 209.
- Remacle, C, Cardol, P, Coosemans, N, Gaisne, M, y Bonnefoy, N. (2006). High-efficiency biolistic transformation of *Chlamydomonas* mitochondria can be used to insert mutations in complex I genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 4771-4776.
- Rochaix, JD. (1992). Post-transcriptional steps in the expression of chloroplast genes. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8, 1-28.
- Rochaix, JD. (1996). Post-transcriptional regulation of chloroplast gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol. Biol.* 32, 327-341.
- Rochaix, JD y Malnoe, P. (1978). Anatomy of the chloroplast ribosomal DNA of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Cell* 15, 661-670.
- Rott, R, Liveanu, V, Drager, RG, Stern, DB, y Schuster, G. (1998). The sequence and structure of the 3'-untranslated regions of chloroplast transcripts are

important determinants of mRNA accumulation and stability. *Plant Mol Biol.* 36, 307-314.

-Sakamoto, W, Sturm, NR, Kindle, KL, y Stern, DB. (1994). petD mRNA maturation in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts: role of 5' endonucleolytic processing. *Mol Cell Biol.* 14, 6180-6186.

-Salvador, ML y Klein, U. (1999). The redox state regulates RNA degradation in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 121, 1367-1374.

-Salvador, ML, Klein, U, y Bogorad, L. (1993a). 5' sequences are important positive and negative determinants of the longevity of *Chlamydomonas* chloroplast gene transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 1556-1560.

-Salvador, ML, Klein, U, y Bogorad, L. (1993b). Light-regulated and endogenous fluctuations of chloroplast transcript levels in *Chlamydomonas*. Regulation by transcription and RNA degradation. *Plant J.* 3, 213-219.

-Salvador, ML, Klein, U, y Bogorad, L. (1998). Endogenous fluctuations of DNA topology in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Cell Biol.* 18, 7235-7242.

-Salvador, ML, Suay, L, Anthonisen, IL, y Klein, U. (2004). Changes in the 5'-untranslated region of the *rbcl* gene accelerate transcript degradation more than 50-fold in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr. Genet.* 45, 176-182.

-Sarkar, N. (1997). Polyadenylation of mRNA in prokaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 173-197.

-Schuster, G, Lisitsky, I, y Klaff, P. (1999). Polyadenylation and degradation of mRNA in the chloroplast. *Plant Physiol* 120, 937-944.

-Shen, Y, Danon, A, y Christopher, DA. (2001). RNA binding-proteins interact specifically with the *Arabidopsis* chloroplast *psbA* mRNA 5' untranslated region in a redox-dependent manner. *Plant Cell Physiol* 42, 1071-1078.

-Sheu, JJ, Yu, TS, Tong, WF, y Yu, SM. (1996). Carbohydrate starvation stimulates differential expression of rice alpha-amylase genes that is modulated through complicated transcriptional and posttranscriptional processes. *J. Biol. Chem.* 271, 26998-27004.

-Shiina, T, Allison, L, y Maliga, P. (1998). *rbcl* Transcript levels in tobacco plastids are independent of light: reduced dark transcription rate is compensated by increased mRNA stability. *Plant Cell* 10, 1713-1722.

- Shrager, J, Hauser, C, Chang, CW, Harris, EH, Davies, J, McDermott, J, Tamse, R, Zhang, Z, y Grossman, AR. (2003). *Chlamydomonas reinhardtii* genome project. A guide to the generation and use of the cDNA information. *Plant Physiol.* 131, 401-408.
- Sieburth, LE, Berry-Lowe, S, y Schmidt, GW. (1991). Chloroplast RNA Stability in *Chlamydomonas*: Rapid Degradation of psbB and psbC Transcripts in Two Nuclear Mutants. *Plant Cell* 3, 175-189.
- Singh, M, Boutanaev, A, Zucchi, P, y Bogorad, L. (2001). Gene elements that affect the longevity of rbcL sequence-containing transcripts in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 2289-2294.
- Small, ID y Peeters, N. (2000). The PPR motif - a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. *Trends Biochem. Sci.* 25, 46-47.
- Somanchi, A, Barnes, D, y Mayfield, SP. (2005). A nuclear gene of *Chlamydomonas reinhardtii*, Tba1, encodes a putative oxidoreductase required for translation of the chloroplast psbA mRNA. *Plant J.* 42, 341-352.
- Staub, JM y Maliga, P. (1995). Expression of a chimeric uidA gene indicates that polycistronic mRNAs are efficiently translated in tobacco plastids. *Plant J.* 7, 845-848.
- Stefano, JE y Gralla, JD. (1982). Spacer mutations in the *lac ps* promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 79, 1069-1072.
- Stern DB y Drager RG. (1998). Chloroplast RNA synthesis and processing. In *The molecular biology of chloroplast and mitochondria in Chlamydomonas.*, Rochaix JD, Goldschmidt-Clermont M, and Merchant S, eds., pp. 165-181.
- Stern, DB y Gruissem, W. (1987). Control of plastid gene expression: 3' inverted repeats act as mRNA processing and stabilizing elements, but do not terminate transcription. *Cell* 51, 1145-1157.
- Stern, DB y Kindle, KL. (1993). 3'end maturation of the *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast atpB mRNA is a two-step process. *Mol Cell Biol.* 13, 2277-2285.
- Stern, DB, Radwanski, ER, y Kindle, KL. (1991). A 3' stem/loop structure of the *Chlamydomonas* chloroplast atpB gene regulates mRNA accumulation in vivo. *Plant Cell* 3, 285-297.
- Sueoka, N. (1960). Mitotic replication of deoxyribonucleic acid in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 46, 83-91.

- Sullivan, ML y Green, PJ. (1996). Mutational analysis of the DST element in tobacco cells and transgenic plants: identification of residues critical for mRNA instability. *RNA*. 2, 308-315.
- Surzycki, SJ. (1969). Genetic functions of the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*: effect of rifampin on chloroplast DNA-dependent RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 63, 1327-1334.
- Tadauchi, T, Matsumoto, K, Herskowitz, I, y Irie, K. (2001). Post-transcriptional regulation through the HO 3'-UTR by Mpt5, a yeast homolog of Pumilio and FBF. *EMBO J*. 20, 552-561.
- Thompson, RJ y Mosig, G. (1990). Light affects the structure of *Chlamydomonas* chloroplast chromosomes. *Nucleic Acids Res*. 18, 2625-2631.
- Tregoning, J, Maliga, P, Dougan, G, y Nixon, PJ. (2004). New advances in the production of edible plant vaccines: chloroplast expression of a tetanus vaccine antigen, TetC. *Phytochemistry* 65, 989-994.
- Troxler, RF, Zhang, F, Hu, J, y Bogorad, L. (1994). Evidence that sigma factors are components of chloroplast RNA polymerase. *Plant Physiol* 104, 753-759.
- Vaistij, FE, Boudreau, E, Lemaire, SD, Goldschmidt-Clermont, M, y Rochaix, JD. (2000). Characterization of Mbb1, a nucleus-encoded tetratricopeptide-like repeat protein required for expression of the chloroplast psbB/psbT/psbH gene cluster in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 14813-14818.
- van, HA y Parker, R. (2002). Messenger RNA degradation: beginning at the end. *Curr. Biol*. 12, R285-R287.
- Voigt, J, Liebich, I, Kiess, M, y Frank, R. (2001). Subcellular distribution of 14-3-3 proteins in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur. J. Biochem*. 268, 6449-6457.
- Walker, SC, Avis, JM, y Conn, GL. (2003). General plasmids for producing RNA in vitro transcripts with homogeneous ends. *Nucleic Acids Res*. 31, e82.
- Walter, M, Kilian, J, y Kudla, J. (2002). PNPase activity determines the efficiency of mRNA 3'-end processing, the degradation of tRNA and the extent of polyadenylation in chloroplasts. *EMBO J*. 21, 6905-6914.
- Wang, Y, Liu, CL, Storey, JD, Tibshirani, RJ, Herschlag, D, y Brown, PO. (2002). Precision and functional specificity in mRNA decay. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 5860-5865.

- Wostrikoff, K, Girard-Bascou, J, Wollman, FA, y Choquet, Y. (2004). Biogenesis of PSI involves a cascade of translational autoregulation in the chloroplast of *Chlamydomonas*. *EMBO J.* 23, 2696-2705.
- Wostrikoff, K y Stern, D. (2007). Rubisco large-subunit translation is autoregulated in response to its assembly state in tobacco chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 6466-6471.
- Yang, J, Schuster, G, y Stern, DB. (1996). CSP41, a sequence-specific chloroplast mRNA binding protein, is an endoribonuclease. *Plant Cell* 8, 1409-1420.
- Yehudai-Resheff, S, Hirsh, M, y Schuster, G. (2001). Polynucleotide phosphorylase functions as both an exonuclease and a poly(A) polymerase in spinach chloroplasts. *Mol Cell Biol.* 21, 5408-5416.
- Yohn, CB, Cohen, A, Danon, A, y Mayfield, SP. (1998). A poly(A) binding protein functions in the chloroplast as a message-specific translation factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 2238-2243.
- Yohn, CB, Cohen, A, Danon, A, y Mayfield, SP. (1996). Altered mRNA binding activity and decreased translational initiation in a nuclear mutant lacking translation of the chloroplast psbA mRNA. *Mol Cell Biol.* 16, 3560-3566.
- Yoshimura, A, Fujii, R, Watanabe, Y, Okabe, S, Fukui, K, y Takumi, T. (2006). Myosin-Va facilitates the accumulation of mRNA/protein complex in dendritic spines. *Curr. Biol.* 16, 2345-2351.
- Zerges, W. (2000). Translation in chloroplasts. *Biochimie* 82, 583-601.
- Zerges, W, Girard-Bascou, J, y Rochaix, JD. (1997). Translation of the chloroplast psbC mRNA is controlled by interactions between its 5' leader and the nuclear loci TBC1 and TBC3 in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Cell Biol.* 17, 3440-3448.
- Zerges, W y Rochaix, JD. (1998). Low density membranes are associated with RNA-binding proteins and thylakoids in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biol.* 140, 101-110.
- Zhang, S y Mehdy, MC. (1994). Binding of a 50-kD Protein to a U-Rich Sequence in an mRNA Encoding a Proline-Rich Protein That Is Destabilized by Fungal Elicitor. *Plant Cell* 6, 135-145.
- Zhang, T, Kruys, V, Huez, G, y Gueydan, C. (2002). AU-rich element-mediated translational control: complexity and multiple activities of trans-activating factors. *Biochem. Soc. Trans.* 30, 952-958.

-Zou, Z, Eibl, C, y Koop, HU. (2003). The stem-loop region of the tobacco psbA 5'UTR is an important determinant of mRNA stability and translation efficiency. *Mol. Genet. Genomics* 269, 340-349.

-Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 31, 3406-3415.